

Aus dem Departement für Nutztiere, Abteilung für Ambulanz und Bestandesmedizin
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun)

**Einfluss kolostraler Antikörper auf die postvakzinale Immunantwort bei
neonatalen Kälbern**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Urs Wetli

Tierarzt
von Küsnacht ZH

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. M. Hässig, Referent

Prof. Dr. M. Suter, Korreferent

Zürich, 2010

Zentralstelle der Studentenschaft

Für Gabi, Aijana und Shania

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. SUMMARY.....	2
3. EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	3
4. LITERATURÜBERSICHT.....	5
4.1. PROTEKTION DES JUNGEN KALBES	5
4.2. IMMUNOLOGIE.....	7
4.2.1. IMMUNKOMPETENZ DES FETEN	8
4.2.2. IMMUNKOMPETENZ DES NEUGEBORENEN.....	9
4.3. IMPFUNG DES JUNGTIERES.....	10
4.4. KOLOSTRUM UND MUTTERTIERIMMUNISIERUNG	12
5. MATERIAL UND METHODIK	15
5.1. VERSUCHSANORDNUNG	15
5.2. VERSUCHSTIERE.....	16
5.3. VAKZINE UND PLACEBO	17
5.4. PROBENGEWINNUNG UND LAGERUNG.....	18
5.5. AUSWERTUNG DER PROBEN	18
5.6. STATISTISCHE METHODEN	21
6. RESULTATE.....	23
6.1. DEFINITIVE VERSUCHSBEDINGUNGEN.....	23
6.2. VERDÜNNUNG DER TESTSEREN	24
6.3. REAKTIONEN DER KÜHE.....	31
6.4. REAKTIONEN DER KÄLBER	34
6.5. KATEGORISCHE AUSWERTUNG	43
7. DISKUSSION.....	57
7.1. ZUVERLÄSSIGKEIT VON LEUCOGEN® BEIM RIND	57
7.2. BEEINFLUSSUNG DER IMMUNANTWORT DES NEONATEN.....	58
7.3. DER FRÜHE IMPFZEITPUNKT DER KÄLBER	59
7.4. EMPFEHLUNGEN.....	59
7.5. AUSSICHT	60
8. LITERATURVERZEICHNIS	61
9. DANKSAGUNG.....	66

1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, wie effizient Impfungen junger Kälber sind und in welchem Masse maternale Antikörper die Immunantwort von Kälbern reduzieren.

Bei frühen Impfungen des Kalbes kommen sich der passive Schutz und die aktive Immunisierung oft in die Quere.

Im Versuch wurden 20 Kuhpaare und deren Kälber beobachtet. Jeweils eine Kuh eines Versuchspaares wurde vor dem Geburtstermin mit einem Placebo geimpft (Gruppe A), die andere mit dem Impfstoff Leucogen® (Gruppe B). Die Kälber wurden alle mit Kolostrum ihrer Mütter getränkt und erhielten am 10. Lebenstag Leucogen® parenteral verabreicht. Blutproben wurden im Labor mittels Elisa auf FeLV-Antikörper untersucht. 30% der geimpften Kühe zeigten eine Serokonversion. Dreizehn dieser zwanzig Tiere gaben Antikörper an ihre Kälber weiter. Elf Kälber aus B konvertierten nicht, im Gegensatz zu vier Kälbern aus A. Die passive Immunisierung beeinflusst also die Impfreaktion des Neonaten.

Alle serokonvertierenden Kälber wiesen anfangs eine tiefe Antikörper-Konzentration auf. A-Kälber zeigten im Mittel eine stärkere Impfreaktion als B-Kälber. Zudem zeigten Kälber der Gruppe B, mit anfänglich tiefem, passivem Antikörper-Niveau, eine stärkere Serokonversion im Vergleich zu den Kälbern aus derselben Gruppe mit anfänglich höheren Antikörper-Konzentrationen.

In zwei Dritteln der Fälle, in denen keine maternalen Antikörper vorlagen, führte die frühe Impfung zu einer angemessenen Reaktion beim Kalb.

2. Summary

The aim of this study was to evaluate the efficiency of vaccination on young calves and to see in which manner the maternal antibodies reduce the immunological response in calves.

At an early stage of life the passive protection and the active vaccination often interfere with each other.

Twenty matched-pairs of cows and their offsprings were studied. Of each pair, one cow received a placebo before term (group A) and the other was vaccinated with Leucogen® (group B). All calves received colostrum from their respective mother. Ten days after birth all calves were vaccinated with Leucogen®. Blood samples from the cows and calves were taken. An ELISA test was done to define the FeLV antibody concentration. 30 % of the B-cows showed a seroconversion. Thirteen out of twenty vaccinated cows passed the antibodies onto their calves. Eleven calves of group B did not convert, and four calves of group A. Mother's vaccination has therefore a direct influence on the calf's reaction to its own vaccination.

All seroconverted calves had low antibody concentration before their vaccination. An average of calves of group A showed a higher reaction to vaccination than the calves of group B. Further, calves of group B with a low passiv antibody level in the beginning showed a higher seroconversion as compared to calves with higher antibody concentration of the same group.

The study proves that two thirds of the calves without maternal antibodies reacted adequately to the vaccination.

3. Einleitung und Zielsetzung

Jungtiererkrankungen beim Rindvieh und dadurch bedingte Behandlungskosten und Ausfälle führen zu hohen wirtschaftlichen Einbussen in der landwirtschaftlichen Produktion. Verschiedene Arbeiten bestätigen gehäufte Krankheits- und Todesfälle bei Kälbern bis zu einem Alter von 6 Monaten und die damit verbundenen ökonomischen Verluste. Zwischen 5.6% und 9.0% aller geborenen Kälber erkranken laut amerikanischen Studien zwischen der Geburt und dem Abtränten (Bellows et al. 1987, Anonym, 1993). Martin et al. (1975) stellten in einer kalifornischen Studie fest, dass die Gesamtmortalitätsrate bei Kälbern zwischen 17.3% und 20.2% lag. Wenig mehr als die Hälfte (55%) aller zu verzeichnenden Abgänge bei Kälbern fielen in die erste Lebenswoche, weitere 27% in die zweite. Infektiöse Geschehen, wie Durchfallerkrankungen, mit einem weltweiten, durchschnittlichen Vorkommen von rund 20% bei neugeborenen Kälbern (Bendali et al. 1999) und respiratorische Leiden spielen dabei die wichtigste Rolle.

Das Bestreben, die Morbiditäts- und Mortalitätsrate bei jungen Kälbern zu senken, ist also aus ökonomischer Sicht gut verständlich, aber auch vom Standpunkt des Tierschutzes, denn ein Leiden der Tiere soll möglichst vermieden werden. Diverse Ansätze werden dabei verfolgt. Den therapeutischen Möglichkeiten steht eine Vielzahl von prophylaktischen Methoden gegenüber. Vor allem immunologische Verfahren (Impf- und Paramunisierungs-Programme) gewinnen dabei, nebst Verbesserungen im Management der Tiere, zunehmend an Bedeutung. Dies nicht zuletzt, weil Antibiotika als Therapeutika, Prophylaktika oder Wachstumsförderer immer wieder im Zusammenhang mit Resistenzentwicklung und Rückstandsproblemen aber auch mit ökologischen Bedenken diskutiert werden (Bryson 1985, Mayr 1991, Staak 1992). Zur Anwendung gelangen vor allem Muttertierimpfungen und Vakzinierungen bei den Kälbern.

Dass die meisten dieser Krankheits- und Todesfälle in eine sehr frühe Phase des Kälberlebens fallen, hat mit der Immunitätslage der Jungtiere zu tun. Kälber kommen zwar grösstenteils immunkompetent zur Welt (Pery und Metzger 1990), aufgrund einer vollständigen Plazentarschranke gegenüber Immunglobulinen aber mit sehr tiefen IgG-Werten. Ihre Serum-IgG-Konzentrationen vor Kolostrumaufnahme bewegen sich je nach Untersuchung zwischen 0.05 und 0.7mg/ml (Husband et al. 1972, Ivanoff 1975, Eigenmann et al. 1983, Kim und Schmidt 1983, Zaremba et al. 1985, Erhard et al. 1999). Die Neonaten sind also auf die passive Versorgung mit Immunglobulinen aus dem Kolostrum angewiesen. Die Übertragung geschieht in den ersten Lebensstunden des Kalbes. Sie dient dem Schutz der Tiere vor Krankheitserregern, bis diese selbst in der Lage sind, sich mit aktiv produzierten Antikörpern zur Wehr zu setzen.

Der Stellenwert dieser frühen Kolostrumaufnahme und der Einfluss auf die Gesundheit des Kalbes sind sehr weitgreifend in der Literatur beschrieben (Larson et al. 1998). 50% der Kälber einer Studie, die an einer infektiösen Krankheit sterben, haben sehr tiefe IgG (um mindestens 2 Standarddeviationen (=SD) tiefer als der Mittelwert), 35% tiefe (zwischen 1 und 2 SD tiefer) und nur die restlichen 15% der umgestandenen Tiere haben annähernd IgG-Konzentrationen im Bereich des normalen Mittelwertes (McGuire et al. 1976). In einer anderen Studie (Wittum und Perino 1995) erkrankt ein Viertel aller Kälber mit zu tiefen IgG-Konzentrationen (<8g/l, gemessen 24 Stunden post natum) bis zum Alter von 28 Tagen, im Vergleich zu nur 5% aller Kälber, die nach Kolostrumaufnahme adäquate >16g/l IgG im Serum aufweisen. 8.3% der Unterversorgten sterben im ersten Lebensmonat im Vergleich zu 1.6% der adäquat Versorgten.

Der Schutz des Neugeborenen durch Kolostrum ist unentbehrlich. Gleichzeitig ist aber eine möglichst frühe und schnelle, aktive Immunreaktion des Kalbes erwünscht, damit keine Lücke im Schutz der Tiere nach Abnahme der maternalen Antikörper im Serum entsteht. Die endogene IgG-Synthese beginnt in den ersten Tagen nach der Geburt und die endogene Serum-IgG-Konzentration nimmt stetig zu, während die maternale exponentiell abnimmt. Der Übergang von der passiv erworbenen, maternalen Immunität zur aktiven, endogenen Immunität stellt eine einschneidende Veränderung im Leben des Kalbes dar und findet zwischen der zweiten und der sechsten Woche nach der Geburt statt (Hässig et al. 2007). Im Gegensatz zu früheren Arbeiten (Erhard et al. 1999) fanden Hässig et al. keine vorübergehende Hypogammaglobulinämie bei Kälbern im Alter zwischen 11 und 28 Tagen.

Ein Problem besteht nun darin, dass passiv erworbene, kolostrale Antikörper die aktive Immunantwort des Kalbes reduzieren (Bögel und Liebelt 1963, Nicholls et al. 1984, Buchholz und Mehlhorn 1985, Kimman et al. 1989, Staak 1992, Larson et al. 1998, Hodgins und Shewen 2000, Larsen et al. 2001).

Mit dieser Arbeit soll anhand eines Modells geprüft werden, in welchem Ausmass diese postnatale Reduktion der Immunantwort der Kälber statt findet und wie effizient Impfungen der Jungtiere zu diesem frühen Zeitpunkt sind. Daraus lassen sich allenfalls Richtlinien zur besseren Kälberbetreuung herleiten.

4. Literaturübersicht

4.1. Protektion des jungen Kalbes

Weil das Kalb mit einem Immunglobulinmangel zur Welt kommt, wird es über das Kolostrum mit Abwehrstoffen versorgt und beginnt, sich mit seiner nicht mehr schützenden Umwelt aktiv auseinander zu setzen. Im Gegensatz zur mit wenigen Ausnahmen keimfreien Umgebung im Uterus des Muttertieres, wird es mit verschiedenen, potentiell krankmachenden Agentien konfrontiert. Dazu gehören subzelluläre biologische Objekte wie Prione, Viroide und Viren, sowie prokaryontische Mikroorganismen wie Chlamydien, Rickettsien, Mykoplasmen und die grosse Gruppe der klassischen Bakterien. Des Weiteren finden sich eukaryontische Mikroorganismen wie die Pilze und die Protozoen sowie einfachere, mehrzellige Tiere wie Helminthen und Arthropoden (Kayser 1997, Mayr 2002). Viele Vertreter dieser Gruppen sind im Stande, Infektionskrankheiten beim Rind zu verursachen. Dies geschieht entweder durch direkte Schädigung des Wirtes oder indirekt über Toxine, die den Wirt krank machen. In jedem Fall findet eine Opsonisierung statt.

Beim neugeborenen Kalb in den ersten Lebenswochen spielen vor allem Durchfallerkrankungen und Infektionen des Respirationstraktes eine Rolle. Was die Pathogenese dieser Infektionskrankheiten betrifft, so finden wir oft gewisse Ähnlichkeiten. Virale Aktivität tritt vor allem in einem frühen Stadium der Erkrankungen auf. Die im Falle von respiratorischen Beschwerden oft gefundenen Parainfluenza-3 (= PI-3) – Viren und Bovinen respiratorischen Synzytial (= BRS) – Viren, aber auch Bovine Virus Diarroe (= BVD) – Viren und Bovine Herpesviren Typ 1 (= BHV-1) gelten dabei als Wegbereiter für sekundäre Beteiligung von Mykoplasmen und Bakterien. Sie richten die schlimmsten Schäden bei seronegativen Kälbern unter 6 Monaten an (Bryson 1985). Der Einfluss von bovinen Coronaviren (= BCV) im Zusammenhang mit Erkrankungen des Respirationstraktes wird noch diskutiert. Bei Durchfallerkrankungen sind die wegbereitenden Viren vor allem die bovinen Rotaviren (= BRV) und BCV.

Aus den bisher genannten Fakten lassen sich verschiedene Schlüsse ziehen. Von grossem Einfluss auf die Überlebensrate der Kälber sind zum einen die Qualität der passiven Immunität und zum anderen die Qualität der aktiven Immunität. Die erst genannte steht in direktem Zusammenhang mit der Konzentration der Antikörper im Kolostrum (Recca et al. 2003), der aufgenommenen Kolostrummenge und dem Zeitpunkt der ersten Kolostrumaufnahme (Pritchett et al. 1991, Bendali et al. 1999). Je früher die erste Kolostrumaufnahme erfolgt, desto höher ist der Ig (Immunglobulin)-Transfer ins Blutssystem des Kalbes (Kruse 1983). Aus Versuchen geht hervor, dass bei Aufnahme von 100% einer Kolostrummenge 6 Stunden nach der Geburt durchschnittlich 66% der Ig-Menge im Serum der Kälber erscheint. Bei Aufnahme derselben Ausgangsmenge 48 Stunden post natum, findet man noch 6% der Ig im Serum (Matte et al. 1982). Es besteht auf der Seite des Kalbes aber auch eine Kapazitätsgrenze in Bezug auf die angebotene Ig-Menge (Besser et al. 1985). Überschüssiges Ig, das nicht mehr ins Serum des Kalbes aufgenommen wird, übt eine lokal schützende Wirkung im Darm des Jungtieres aus (Logan et al. 1974, Snodgrass and Wells 1978). Dieser Effekt ist vor allem in Bezug auf die Prophylaxe von Durchfällen sehr positiv zu werten. Studien von Snodgrass et al. (1982) belegten den positiven Effekt eines Tränkeregimes, bei dem mit Rotavirus-Antikörpern angereichertes Immunkolostrum 14 Tage zur normalen Tränke beigemischt wurde. Während eines natürlichen Ausbruchs einer ätiologisch komplexen Diarrhöe, erkrankten derartig gefütterte Kälber tendenziell weniger und zu einem späteren Zeitpunkt. Die Dauer und der Schweregrad des Durchfalls bei diesen Kälbern waren signifikant verringert.

Ein weiteres grosses Gebiet, welches die Qualität der passiven Immunität durch mehrere Faktoren beeinflusst, ist das Management der trächtigen Kuh und ihres Kalbes rund um die Geburt. Im angelsächsischen Raum hat diese Periode einen solch hohen Stellenwert, dass ihr ein eigener Name gegeben wird: transition time. Verschiedene Autoren messen dem reibungslosen Geburtsablauf diesbezüglich den grössten Wert bei. Larson et al. (1998) gehen noch einen Schritt weiter. Aus ihrer Arbeit geht hervor, dass der wichtigste Faktor, der die neonatale Krankheits- und Todesfallrate beeinflusst, das Alter des Muttertieres ist. Kälber von Färsen sterben bei der Geburt in 5% der Fälle, Kälber von Kühen nur in 1.6%. Diese Zahlen zeigen den direkten Einfluss von Geburtsproblemen auf die Sterblichkeit.

Der indirekte Einfluss hat mit der oben genannten, schlechten, passiven Immunisierung zu tun und wird in derselben Arbeit abgehandelt. In den ersten drei Lebenswochen sterben die Jungtiere von Erstgebärenden mit einer Wahrscheinlichkeit von 3.8%, während bei Kühen nur 1.8% Ausfälle zu verzeichnen sind. Zwischen 31.8% und 50% aller Todesfälle bis zum Abtränken sind auf Geburtsprobleme zurückzuführen. Die meisten dieser Tiere sterben in den ersten 10 Tagen post natum, primär als Folge von infektiösen Krankheiten wie Durchfall oder Pneumonie. Die Wahrscheinlichkeit, kurz nach der Geburt zu erkranken, ist für ein Kalb, das eine Schweregeburt überstanden hat, 2.6- bis 6-mal grösser als für ein normal zur Welt gekommenes Tier. Bendali et al. (1999) finden bei Kälbern, denen Geburtshilfe geleistet werden musste, ebenso wie bei Neugeborenen, die kurz nach der Geburt Dyspnoe zeigten, ein signifikant erhöhtes Risiko, im ersten Lebensmonat an Durchfall zu erkranken.

Geburtsprobleme führen nicht nur zu einem weniger effektiven passiven Immunglobulin-Transfer durch die verspätete Kolostrumaufnahme der gestressten Neugeborenen, sondern auch zu längerem Liegen und damit zu grösserer Verschmutzung mit fäkalen Pathogenen. Auch Besser et al. (1990) beschreiben die postnatale respiratorische Azidose als eine der klinischen Ursachen für den schlechten, passiven Transfer von Antikörpern.

Eine Vielzahl weiterer Faktoren tragen zum Gelingen der Übertragung passiven Schutzes bei, wie die Fütterung des trächtigen Muttertieres oder aber auch die Hygienemassnahmen rund um die Geburt, was den Infektionsdruck auf das Neugeborene verringert. Sie sollen an dieser Stelle nur erwähnt, aber nicht weiter diskutiert werden. Dem grossen Thema der Muttertierimmunisierung, welches in indirektem Zusammenhang mit der Qualität der passiven Immunität steht, wird später ein eigenes Kapitel gewidmet.

Neben der Qualität der passiven Immunität spielt für die Gesundheit des Kalbes auch die Qualität der aktiven Immunität eine entscheidende Bedeutung. Die Frage nach der Immunkompetenz des Kalbes steht hier im Vordergrund. Dieser Aspekt wird später in einem eigenen Kapitel behandelt.

Zu erwähnen sind an dieser Stelle noch verschiedene Umweltfaktoren, die ganz allgemein das Wohlbefinden und im Speziellen die Immunkompetenz des Kalbes beeinflussen. Eine Vielzahl von Arbeiten zur Steigerung der immunologischen Reaktivität des Kalbes nach aktiver Immunisierung liegt vor (Buchholz und Mehlhorn 1985). Die Autoren selbst untersuchen in ihrer Arbeit die humorale Immunreaktion des Kalbes unter verschiedenen Lichteinflüssen und stellen dabei fest, dass sichtbares Licht das Antikörperbildungsvermögen des Kalbes nach Antigenreiz beeinflusst. Eine überwiegende Haltung der Tiere im Dunkeln setzt die Antikörperbildung herab. Nicht nur die Lichtdauer, sondern auch die Beleuchtungsstärke spielt dabei eine Rolle. Zu hohe Lichtintensitäten sind eine Belastung für die Tiere, was zu einer verminderten Antikörperproduktion führt. Licht als Stressor beeinträchtigt die Bildung von Antikörpern. May et al. (1979) nutzen dieses Phänomen schon früher, um zu zeigen, dass sich Stressfaktoren, unabhängig welcher Natur, beim Kalb negativ auf das Immunsystem auswirken. Bei Kälbern im Alter von über 6 Monaten ist der Effekt deutlicher zu sehen. Bei jüngeren Kälbern (<3 Monate) bleibt ein Antikörperanstieg nach Vakzinierung praktisch ganz aus. Dies bedeutet nicht, dass jüngere Tiere stressresistenter sind. Vielmehr muss hier die unterschiedliche immunologische Reife der Tiere zur Erklärung der Ergebnisse herangezogen werden.

4.2. Immunologie

Die Immunologie ist die Lehre von den spezifischen Reaktionen des Organismus gegen körperfremde Substanzen, ihren stofflichen Grundlagen, Mechanismen und Phänomenen (Kötsche 1991). Mit dem Immunsystem hat man sich ursprünglich im Rahmen der Mikrobiologie als einem Abwehrsystem gegen pathogene Mikroorganismen beschäftigt. Erst später wurde seine Eigenschaft als Behüter der chemischen Einzigartigkeit jeder biologischen Art und jedes Individuums bewiesen. Die Immunologie entwickelte sich in den letzten Jahrzehnten rasant zu einer selbständigen wissenschaftlichen Fachrichtung.

Der älteste Abwehrmechanismus ist die Phagozytose. Sie wird schon von den Bakterien und den einfachsten Wirbellosen genutzt. Das hochkomplexe Immunsystem der Säugetiere ist aber zu weit mehr fähig. Es ist in der Lage, nicht nur pathogene Mikroorganismen (allgemein körperfremde Substanzen) zu erkennen und zu eliminieren, sondern auch vorteilhafte Mikroorganismen zu tolerieren (Ferenčík et al. 2006). Daneben besitzt es, wie das neuronale System der Lebewesen, aber im Gegensatz zum Hormonsystem, eine gewisse Gedächtnisfunktion.

Während also die traditionelle Immunologie humorale Antikörper und Immunzellen als zentrale Bausteine sieht, versteht die moderne Immunologie die Abwehr als ein System verschiedenartiger Zellen, die miteinander mittels löslicher Mediatoren und Adhäsionsmolekülen auf ihren Oberflächen in Wechselwirkung treten (Jungi 2000). Die Abwehrzellen gehen dabei aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark hervor. Im Unterschied zu anderen Organsystemen bildet das Immunsystem keine abgegrenzte anatomische Struktur sondern ein diffuses Organ (Ferenčík et al. 2006). Das Immunsystem reguliert sich selbst, unterliegt aber auch einer externen Kontrolle, zum Beispiel durch das neuroendokrine System. Entgleisungen werden heute in Zusammenhang mit der Onkogenese gebracht (Jungi 2000).

Die Phylogenese des Abwehrsystems, die Entwicklung also dieses „Sinnesorgans“, parallel zur Entwicklung vom einfachsten bis zum heutigen, hochkomplexen Lebewesen über 500 Millionen Jahre, soll an dieser Stelle nicht weiter erklärt werden. Es sei dabei auf aktuelle und ausführliche Lehrbücher verwiesen (Mayr 2002). Der Ontogenese des Immunsystems ist hingegen das folgende Kapitel gewidmet.

4.2.1. Immunkompetenz des Feten

Um die Frage nach der Immunkompetenz des neonatalen Kalbes besser beantworten zu können, muss man zuerst die Ontogenese des Immunsystems genauer beschreiben. Das Kalb erwirbt die Fähigkeit, einen Antigenreiz zu beantworten nur schrittweise in seinem embryonalen und fetalen Leben (Pery und Metzger 1990). In welchen Zeitabschnitten dies geschieht, zeigen uns die Entwicklung, der mit dem Abwehrsystem verbundenen Zellen und der lymphoiden Organe, sowie das Auftreten von Antikörpern.

Die Stammzellen immunkompetenter Zellen findet man in der Leber des Embryos bereits zehn Tage nach der Konzeption. Sie besiedeln der Reihe nach den Thymus (um den 42. Tag der Trächtigkeit), die Lymphknoten (ab 48 Tagen), das Knochenmark (um den 50. Tag) und die Milz (ab 65 Tagen nach Beginn der Trächtigkeit). Die Differenzierung der Gewebe in diesen Organen findet aber erst später, nämlich ab dem 100. Tag statt. Die Peyer'schen Platten im Darm (Ileum), die später das B-Zell-Reifungsorgan der Wiederkäuer darstellen, können ab dem 150. Tag der Trächtigkeit beobachtet werden (Pery und Metzger 1990).

Diese Angaben sagen aber noch wenig aus über die Aktivität des Immunsystems im ungeborenen Kalb. Zur etwas genaueren Betrachtung muss man die durch T-Zellen vermittelte, zelluläre Immunität von der durch B-Zellen vermittelten, humoralen Immunität unterscheiden. Die zelluläre Immunität ist hauptsächlich verantwortlich für die Erkennung von intrazellulären Erregern, für die Tumorabwehr und die Transplantat-Abstossung (Jungi 2000). Letzteres ist im Rinderfeten ab dem 120. Tag der Trächtigkeit zu beobachten (Pery und Metzger 1990). Obwohl die Zahl der reifen T-Zellen während der Trächtigkeit laufend ansteigt, wird die vollständige Reife erst einige Wochen post partum erreicht (Mayr 2002). Die humorale Immunität ist stark vergesellschaftet mit der Funktionsfähigkeit der B-Zellen, welche die Vorläufer der Antikörper produzierenden Plasmazellen sind (Jungi 2000). Sie ist wichtig für das Neutralisieren extrazellulärer Pathogene und deren Antigenen. IgM enthaltende Zellen sind erstmals am 59. Tag der Trächtigkeit festgestellt worden, IgG enthaltende Zellen am 145. Tag. Freie Immunglobuline waren im Serum des Feten am 110. Tag (IgM) respektive am 150. Tag (IgG) nachweisbar (Pery und Metzger 1990).

Eine recht deutlich ausgeprägte Immunkompetenz der Feten ist demzufolge bereits früh, ab der Hälfte der Trächtigkeit zu erwarten. Eine differenziertere Betrachtung zeigt aber, dass diese nicht auf jeden Antigenreiz genau gleich früh reagieren, was verschiedene Versuche gezeigt haben. Je nach verwendetem Antigen ist das zeitliche Auftreten der Antwort verschieden. Je kleiner das Antigen ist, desto früher im fetalen Stadium wird es erkannt. Die Immunglobulinklassen, die nach dem Reiz am stärksten zunehmen sind IgM und IgG1. Der Anstieg von IgG2 oder IgA bleibt relativ gering. Mehr als 90% der Feten im Alter zwischen 235 und 270 Tagen besitzen Immunglobuline im Serum.

Im Zusammenhang mit Abwehrvorgängen trifft man häufig auf entzündliche Geschehen. Neben den Zytokinen spielt hier das Komplementsystem eine wichtige Rolle. Das Komplement im Serum des Feten ist vom 4. Monat an vorhanden. Seine Konzentration bei Geburt beträgt etwa 1/5 der Konzentration des erwachsenen Rindes.

4.2.2. Immunkompetenz des Neugeborenen

Bei der Besprechung der Immunkompetenz des Neugeborenen muss zuerst definiert werden, um welchen Zeitrahmen es sich dabei genau handelt. Bendali et al. (1999) sprechen im ersten Monat post natum von der Neugeborenen-Phase, während Schätz (1991) diese Periode der Umstellung und Anpassung vom intrauterinen an das extrauterine Leben beim Rind auf ungefähr 14 Tage veranschlagt. Es wäre durchaus auch sinnvoll, diese Zeitspanne in Anbetracht der immunologischen Situation beim Kalb etwas auszudehnen und mit 6 Wochen anzugeben. Während dieser Zeit sollte bei den meisten Kälbern der Übergang von der maternal dominierten Immunität zur aktiven, endogenen Immunität statt gefunden haben (Hässig et al. 2007).

Wie im vorangehenden Kapitel bereits festgehalten, kommt das Kalb zwar grösstenteils immunologisch kompetent aber immunologisch unerfahren zur Welt (Pery und Metzger 1990). Die präkolostralen Serum-Ig-Konzentrationen sind sehr tief, wobei die Konzentration von IgM durchschnittlich dreimal höher ist, als diejenige des IgG (Ivanoff und Renshaw 1975). Über die Normalwerte erhöhte IgM- und IgG-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt sind Indikatoren für eine Antigenstimulation in utero. Die angeborene Immunität und deren hauptsächlich durch Neutrophile und Makrophagen geleitete Immunreaktion nehmen mit fortgeschrittener Trächtigkeitsdauer zu, erfahren aber gegen den Schluss der Trächtigkeit eine Abnahme in ihrer Funktion, ausgelöst durch den fetalen Cortisol-Anstieg, was das Immunitätsloch zum Zeitpunkt der Geburt zusätzlich verstärkt und die Aufnahme von maternalen Antikörpern noch dringlicher macht (Barrington 2001).

Weil in der Neugeborenenphase die maternalen Antikörper das Immunsystem des Kalbes massgeblich beeinflussen, ist es schwierig, die Immunkompetenz des Neugeborenen losgelöst von diesem Einfluss zu betrachten. Verschiedene Untersuchungen, die zum Teil auch an kolostrumfrei aufgezogenen Kälbern durchgeführt wurden, brachten spezifische Resultate. Die Synthese der vier Typen von Immunglobulinen IgG1, IgG2, IgM und IgA beginnt bei Tieren, denen man Kolostrum vorenthalten hat, sofort nach der Geburt. Am 128. Tag ist die Konzentration aller Immunglobuline in den Seren der Kälber ohne Kolostrum höher, als in den Seren der Tiere mit Kolostrum (Pery und Metzger 1990). Zu Beginn der endogenen Antikörpersynthese wird vor allem IgG2 produziert (Steinbach und Meyer 1977). In Untersuchungen von Banks (1982) bei Kälbern, die kein Kolostrum erhalten haben, sind IgM und IgA am 4., IgG2 am 8. und IgG1 am 32. Tag post natum messbar. Derselbe Autor stellt fest, dass das Abwehrsystem des neugeborenen Kalbes antigene Reize in einer altersabhängigen Sequenz beantwortet. Antikörperproduktion gegen Salmonella dublin kann man beispielsweise erst ab dem 24. Tag feststellen, jene gegen PI-3-Viren schon vor 14 Tagen. Es besteht diesbezüglich auch eine gewisse Variation in der Intensität der Reaktion in Abhängigkeit von der Rasse (Pery und Metzger 1990).

Die frühe Reaktion hängt also stark zusammen mit der Art des Antigens. Kohlenwasserstoffe im Speziellen sind beim Jungtier oft nicht immunogen, und die Immunogenität von Kapselpolysacchariden von Bakterien variiert extrem in den ersten Lebensmonaten (Hodgins und Shewen 2000). Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass die Immunkompetenz von der Grösse des Antigens abhängig ist. So werden Viren früher immunologisch erkannt als Parasiten.

Eine frühe Antikörperbildung durch das Neugeborene ist grundsätzlich möglich. Beeinflusst wird diese Immunkompetenz, nebst den bereits genannten Faktoren, auch durch angeborene oder erworbene Immundefekte (Jungi 2000). Im Zusammenhang mit erworbenen Immundefekten sind an dieser Stelle virale Infektionen (beispielsweise durch PI-3-Viren oder BVD-Viren) zu nennen, die eine Immunsuppression verursachen oder zu persistent infizierten Kälbern führen können, aber auch Stress durch Transporte, Crowding, operative Eingriffe und Anästhesien (Kastration, Enthornung) sowie Mangelernährung (Mangel an Vitaminen A, B E, oder Eisenmangel).

4.3. Impfung des Jungtieres

Ziel eines jeden Landwirten ist es, seine neugeborenen Kälber möglichst gut und schnell vor verschiedenen Infektionserregern zu schützen, die es in der frühen Lebensphase gefährden könnten. Einerseits besteht hier die Möglichkeit der passiven Immunisierung über das Kolostrum, auf die im nächsten Kapitel eingegangen wird. Andererseits gibt es auch die Möglichkeit der aktiven Schutzimpfung des Kalbes, das zu diesem Zeitpunkt doch zum grössten Teil immunkompetent ist und reagieren dürfte.

Die Vakzination nutzt die phylogenetisch jüngsten Mechanismen des Abwehrpotentials. Diese wirken streng antigenspezifisch. Werden sie über die Schutzimpfung endogen stimuliert, kommt es zur Antikörper- und/oder zur Immunzellbildung und damit zur Ausbildung oder Steigerung einer spezifischen Immunität. Der Erfolg einer Vakzinierung hängt dabei neben der Qualität des Impfstoffs sehr wesentlich von der Reaktivität des Immunsystems des Impflings ab (Mayr 2002).

Bei der aktiven Immunisierung kommen verschiedene Impfstoffarten zum Einsatz. Auf der einen Seite ist die Gruppe der Lebendimpfstoffe mit avirulenten oder schwach virulenten, homologen oder heterologen Impfstoffen, die sich in der Regel im Impfling noch vermehren und in diesem eine Immunität gegen virulente Feldstämme hervorrufen. Die Impfstämme kommen dabei aus der Natur, werden biologisch attenuiert oder gentechnologisch verändert.

Auf der anderen Seite ist die Gruppe der inaktivierten Impfstoffe, oder besser der Impfstoffe aus nicht vermehrungsfähigem Antigen (auch Totvakzinen genannt). Es gelangen dabei inaktivierte Ganzkeime oder Subunits oder gentechnologisch oder synthetisch hergestellte Antigenkomponenten zum Einsatz. All diese inaktivierten Impfstoffe benötigen zusätzlich Adjuvantien oder Adsorbenzien zur Steigerung der immunisierenden Aktivität. Erst jüngere Forschungsergebnisse belegen wieder, dass die Immunantwort in Abhängigkeit des gewählten Adjuvans ganz unterschiedlich ausfallen kann (Morein et al. 2002). Die Erfahrung in der Praxis hat gezeigt, dass die immunologische Wirksamkeit nachlässt, je reiner und spezifischer ein Impfantigen ist (Mayr 2002).

Daneben gibt es Toxoidimpfstoffe (vor allem gegen gewisse Exotoxine von Bakterien), Vektorimpfstoffe (= rekombinierte Vakzinen), die als Vektoren zum Beispiel Pockenviren benötigen oder DNA-Vakzinen (= antigenfreie Impfstoffe).

Eine andere Unterteilung der Impfstoffe geschieht nach dem Gesichtspunkt, ob gegen einen oder mehrere Erreger immunisiert werden soll. Einfachimpfstoffe sind gegen ein Antigen gerichtet. Im Gegensatz dazu sind polyvalente Impfstoffe gegen mehrere Serotypen einer einzigen Erregerspezies und Kombinationsvakzinen gegen mehrere Antigene unterschiedlicher Spezies gerichtet. Letztere können additiv oder synergistisch sein. Synergistische Kombinationsvakzinen werden zur Bekämpfung von Mischinfektionen oder infektiösen Faktorenkrankheiten, wie der Rinder Grippe eingesetzt, bei denen erst durch das synergistische Zusammenwirken mehrerer Erreger eine Krankheit induziert werden kann.

Unterschiedliche Applikationsmethoden der Impfstoffe sind insofern wichtig, als gilt, dass sich parenteral (i.m./s.c.) verabreichte Schutzimpfungen immunologisch nur systemisch auswirken, während lokale Schutzimpfungen (oral = Schluckimpfung, intra nasal) eine lokale und gleichzeitig auch eine partiell systemische Immunität induzieren. Bei diesen lokalen Schutzimpfungen, die bis zu einem gewissen Grade den Einfluss maternaler Antikörper auf eine Immunantwort umgehen, liegt ein grosses Potential, da sie bereits bei jüngeren Tieren eingesetzt werden können (Chase et al. 2008). Im Falle der Anwendung intranasaler und ähnlicher Impfstoffe werden oft tiefe oder gar keine systemischen Antikörper-Titer vorgefunden, was den Nachweis einer „Serokonversion“ verunmöglicht (Ellis et al. 2007).

Die aktive Schutzimpfung führt zur Bildung einer humoralen, wie auch zu einer zellulären und bei lokaler Applikation auch zu einer lokalen Impfmunität. Die zelluläre Immunität entwickelt sich am schnellsten. Ihre wichtigste Funktion ist die Zytotoxizität, das heisst die Eliminierung von „fremden“, kranken oder infizierten Zellen. Einige Tage später treten erste Anzeichen einer humoralen Impfmunität auf, sprich Antikörper im Serum. IgM können als eine erste, noch nicht endgültige Stufe aufgefasst werden. IgG, die besonders gut durch bakterielle Toxoide und Viren stimuliert werden, bilden die definitive, belastbare und über längere Zeit anhaltende Phase der humoralen Immunität (Mayr 2002).

Ein zentrales Merkmal des adaptiven, antigenspezifischen Immunsystems ist, einer wiederholten Antigenexposition mit einer beschleunigten und verstärkten Abwehrantwort zu begegnen, was in den meisten Fällen zu keinen oder nur milden Krankheitssymptomen führt. Auf diesem Prinzip beruht die Immunprophylaxe durch Impfung. Die anamnestic Immunantwort (= immunologische Zweitreaktion) ist bedingt durch das immunologische Gedächtnis (Jungi 2000). Sowohl T- als auch B-Lymphozyten können nach Antigenkontakt in Memory-Zellen transformiert werden (Mayr 2002).

Neben der aktiven Schutzimpfung existieren auch passive Schutzimpfungen mit Immunseren oder gereinigten Antikörper-Präparationen, also spezifischen Immunglobulinen, die auf den Impfling übertragen werden (siehe auch Kapitel Kolostrum). Diese wirken sofort, werden aber schnell wieder abgebaut, da als fremd erkannt. Appliziert werden diese Impfseren meist parenteral (Mayr 2002). Eine Ausnahme bildet hier die prophylaktische oder therapeutische orale Applikation von Immunglobulinen im Zusammenhang mit Neugeborenen-Durchfällen beim Kalb (Snodgrass et al. 1982).

Junge Kälber sollten nun bereits unmittelbar nach der Geburt einen belastbaren Schutz aufweisen, da Jungtiererkrankungen, beispielsweise durch Rotaviren oder E.coli verursachte Durchfälle, schon in den ersten Tagen post natum auftreten (Staak 1992, Larson et al. 1998). Die aktive Immunisierung ist hier nur bedingt angebracht, da zu wenig Zeit bleibt für die Ausbildung einer Immunität. Ein möglicher Ansatz, dieses Problem zu umgehen, wäre die intraamniotische Vakzinierung des Feten einige Tage vor der Geburt, was tatsächlich zu einem Schutz vor frühen Infektionen führen kann, aber wegen zu hoher Ausfälle wie Aborten, Totgeburten oder Frühgeburten mit prämaternen Früchten nicht praxistauglich ist (Ivanoff und Renshaw 1975, Conner et al. 1977, Mullaney et al. 1988, Morrill et al. 1997).

Die konkrete Impfpraxis konzentriert sich demnach auf die frühe aktive Immunisierung der Neugeborenen, wobei verschiedene Impfstoffe oft in Form von polyvalenten Impfstoffen oder Kombinationsvakzinen gegen Pneumonie-Erreger und Mikroorganismen, die Durchfall verursachen, zur Verfügung stehen. Dabei wird aber, wie zum Beispiel bei BRSV, nicht immer eine stabile Immunität ausgebildet (Selbitz und Moos 1997). Die Vakzinierung macht nur bedingt Sinn, da kein rechtzeitiger Schutz aufgebaut werden kann. Durch diese Impfungen kann die Virusausscheidung der später infizierten Tiere oft reduziert und folglich der Infektionsdruck in einer Population herabgesetzt werden (Bögel und Liebelt 1963, Bryson 1985, Kimman et al. 1989, Mayr 1991, Kohara et al. 1997, Larson et al. 1998, Bendali et al. 1999). Larson et al. (1998) postulieren, dass Kälber mit Durchfall das primäre Reservoir für Durchfallerreger sind, sowie subklinisch infizierte Kälber und erwachsene Kühe. Der Infektionsdruck gegen Ende der Kalbesaison ist deshalb erhöht.

Einen etwas anderen Weg der Infektionsprophylaxe beschreitet die Paramunisierung, die den unspezifischen Teil des Immunsystems aktiviert (Mayr 1991, Jungi 2000, Mayr 2002). Zum Einsatz kommen Zytokine, Bakterienextrakte oder attenuierte und inaktivierte Pockenviren, die das Abwehrsystem stimulieren. Sie sind nicht immunisierend und daher ohne Booster-Effekt, wirken innerhalb von Stunden aber nur über eine kurze Zeit von einigen Tagen, lassen sich mit Impfungen kombinieren und überbrücken dabei die schutzlose Phase der Kälber bis zum Auftreten spezifischer Immunreaktionen. Paramunitätsinducer sollen auch metaphylaktisch zu Beginn einer Infektionskrankheit eingesetzt werden können.

4.4. Kolostrum und Muttertierimmunisierung

Für den Schutz des Kalbes von zentraler Bedeutung ist die passive Immunisierung über das Kolostrum. Damit in Verbindung steht die Immunisierung des Muttertieres während der späten Trächtigkeit. Serum-Immunglobuline der Kuh werden in den Tagen vor der Geburt selektiv im Kolostrum angereichert. Während die IgG1- und die IgM-Konzentrationen im Blut der Kuh vor der Geburt abnehmen, bleibt die IgG2-Konzentration praktisch konstant. Im Kolostrum steigt vor allem die IgG1-Konzentration stark an, so dass dort ein Verhältnis von IgG1 zu IgG2 von ungefähr 20: 1 herrscht, während es im Serum 1:1 bis 1:1.5 beträgt. Bei der Geburt des Kalbes sind die durchschnittlichen Konzentrationen von IgG im Serum und im Kolostrum der Kuh 25 respektive 45mg/ml. Die IgM-Konzentration beträgt in beiden Flüssigkeiten ungefähr 3mg/ml. Grosse Variationen dieser Werte treten aber von Kuh zu Kuh und auch von Viertel zu Viertel auf (Pery und Metzger 1990).

Verschiedene Faktoren beeinflussen diese Anreicherung und damit die Konzentration von Immunglobulinen im Kolostrum. Generell führt die genetische Selektion der Kühe aufgrund der Milchmenge, was ja die Basis der Milchindustrie ist, zu immer höherer Milchleistung pro Tier und damit zu einer kleineren Dichte der Immunglobuline im Kolostrum (Prichett et al. 1991). Dieselben Autoren finden bei Holsteinkühen in ihrem Versuch eine mittlere IgG1-Konzentration im Kolostrum von 48.2mg/ml, wobei die Standardabweichung 21.9mg/ml beträgt. Aus der gleichen Arbeit geht hervor, dass das Gesamt-Gewicht des erstgemolkenen Kolostrums am stärksten signifikant mit der Immunglobulin-Konzentration im Kolostrum korreliert. Je höher das Gewicht ist, desto tiefer sinkt die Konzentration. Von weiterer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang die Länge der Trockenperiode, die ihrerseits das Gewicht des erstgemolkenen Kolostrums beeinflusst, tendenziell die Laktationsnummer, sowie die komplette Milch- und Fett-Produktion über die Laktation. Keinen signifikanten Einfluss hatte die Kalbesaison. Andere Autoren kommen je nach Versuchsanordnung und angewandter statistischer Auswertung nicht zu den gleichen Ergebnissen (Lambrecht et al. 1982). Laut Prichett et al. (1991) hat also Kolostrum von älteren Kühen, das beim ersten Mal nur in geringen Mengen gemolken werden kann, die durchschnittlich höchste Konzentration an IgG. Dies hat bei der routinemässigen Verabreichung gepoolten Kolostrums einen Einfluss auf die Auswahl der Kühe, von denen in den Pool gemolken wird.

Im Gegensatz zur selektiven Anreicherung der Immunglobuline im Kolostrum ist die Aufnahme aus dem Darm ins Serum beim Kalb in den ersten 48 Stunden nach der Geburt kein selektiver Vorgang. Auch artfremde Makromoleküle der gleichen Grösse gelangen auf demselben Weg der Pinozytose durch die Epithelzellen des Darmes ins Kälberserum, was eine Substitution des bovinen Kolostrums durch artfremdes Kolostrum oder andere Ig-Quellen möglich macht (Staak 1992). Kolostrumersatz und gefrorenes Kolostrum, mit der Flasche oder der Sonde verabreicht, sind jedoch nicht so effektiv wie das natürliche Saugen und reduzieren die Erkrankungs- und Todesrate nicht (Larson et al. 1998).

In der Praxis sollten die Kälber also möglichst innerhalb von 12 Stunden viel (in der Regel 2 Liter) und spezifisches Kolostrum-Ig direkt von der Mutter saugen, um Serum-IgG1-Konzentrationen von über 16g/l zu erlangen, was in der Literatur als Grenzwert für eine ausreichende Versorgung vorgeschlagen wird (White und Andres 1986). Kälber, denen dabei Kolostrum mit weniger als 100g Immunglobulin zur Verfügung steht, haben ein erhöhtes Risiko mangelnder, passiver Übertragung (Prichett et al. 1991).

Nebst der absoluten Menge an Immunglobulinen im Kolostrum entscheidet vor allem auch die Spezifität der angereicherten Immunglobuline über den Erfolg des späteren Schutzes des Kalbes vor Infektionskrankheiten. An diesem Punkt greift die Vakzinierung des Muttertieres an. Wie beim Kalb kommen auch hier Lebendimpfstoffe oder inaktivierte Impfstoffe, die gegen einen oder mehrere Erreger gerichtet sind, zum Einsatz. Die Impfstoffe, die zur Muttertierimmunisierung entwickelt werden, haben zum Ziel, die Menge und Dauer der spezifischen Antikörper im Sekret des Euters zu erhöhen, um einen möglichst spezifischen Schutz auf das Jungtier zu übertragen (Recca et al. 2003). Die Wirksamkeit solcher Impfstoffe unter praktischen Bedingungen, im Bereich der Neugeborenen-Durchfälle wie auch bei den Erkrankungen des Respirationstrakts, wird in vielen Versuchen bewiesen (Snodgrass et al. 1982, Hofmann 1987, Cornaglia et al. 1992, Bendali et al. 1999, Recca et al. 2003). Grundsätzlich korrelieren die Mengen der vermittelten Antikörper und der Schutz des Empfängertieres positiv (Staak 1992). Die Muttertierimmunisierung ist prophylaktisch erfolgreicher als der therapeutische, parenterale Einsatz spezifischer Immunglobuline, wo sehr hohe Dosen nötig sind.

Appliziert werden die Impfungen beim Muttertier mit wenigen Ausnahmen meist zweimal in der Hochträchtigkeit im Abstand von 4-6 Wochen (Grundimmunisierung) und einmal im Folgejahr in der gleichen Phase der Trächtigkeit (Booster-Impfung). Hofmann (1987) untersucht dieses Impfschema genauer und stellt dabei fest, dass im Problembetrieb der Schutz der Muttertiervakzination nur von längerer Dauer ist, wenn sie mindestens über drei Jahre durchgeführt wird. Nach frühzeitigem Sistieren des Impfprogramms treten regelmässig Rezidive auf. Eine einmalige Booster-Impfung, 20–30 Tage vor der Geburt reicht aus, um hohe Antikörper-Titer im Kolostrum zu erreichen. Die Antikörper in der Milch, 7 Tage nach der Geburt, wären aber vermutlich bei zweimaliger Revakzination höher.

5. Material und Methodik

5.1. Versuchsanordnung

Die Studie wurde so konzipiert, dass sich die aktive Immunantwort bei den Kälbern mit und ohne spezifische Antikörper von der Mutter, welche durch das Kolostrum an das Kalb vermittelt werden, vergleichen liess.

Versuchspaare (matched pair), bestehend aus 2 trächtigen Kühen (Kuh A und Kuh B) aus ein und demselben Stall wurden gebildet. Die eine Kuh eines solchen Paares wurde 8 und 4 Wochen vor dem errechneten Geburtstermin mit dem Antigen geimpft, während der anderen Kuh jeweils zum gleichen Zeitpunkt ein Placebo injiziert wurde. Beide Kühe kalbten später im Betrieb des Besitzers ab, und den Kälbern wurde innerhalb der ersten 12 Lebensstunden mindestens 2 Liter Kolostrum des eigenen Muttertieres verabreicht.

Alle Kälber wurden am 10. Tag nach ihrer Geburt beprobt und mit demselben Antigen wie die Hälfte aller Versuchskühe geimpft. Weitere Entnahmen von Blutproben fanden bei ihnen am 7., am 14., am 21. und am 28. Tag nach der Impfung statt, um den Verlauf der Immunantwort auf die aktive Immunisierung zu dokumentieren (Abbildung 1). Bei den Kühen wurden Blutproben vor der ersten Injektion mit Antigen oder Placebo gewonnen und zum Zeitpunkt der Kälberimpfung.

In einem Protokoll wurden der Geburtsablauf sowie die Menge und der Moment des aufgenommenen Kolostrums durch den Bauern festgehalten. Den Allgemeinzustand eines jeden Tieres beurteilte der Tierarzt bei dessen Vakzinierung oder Beprobung.

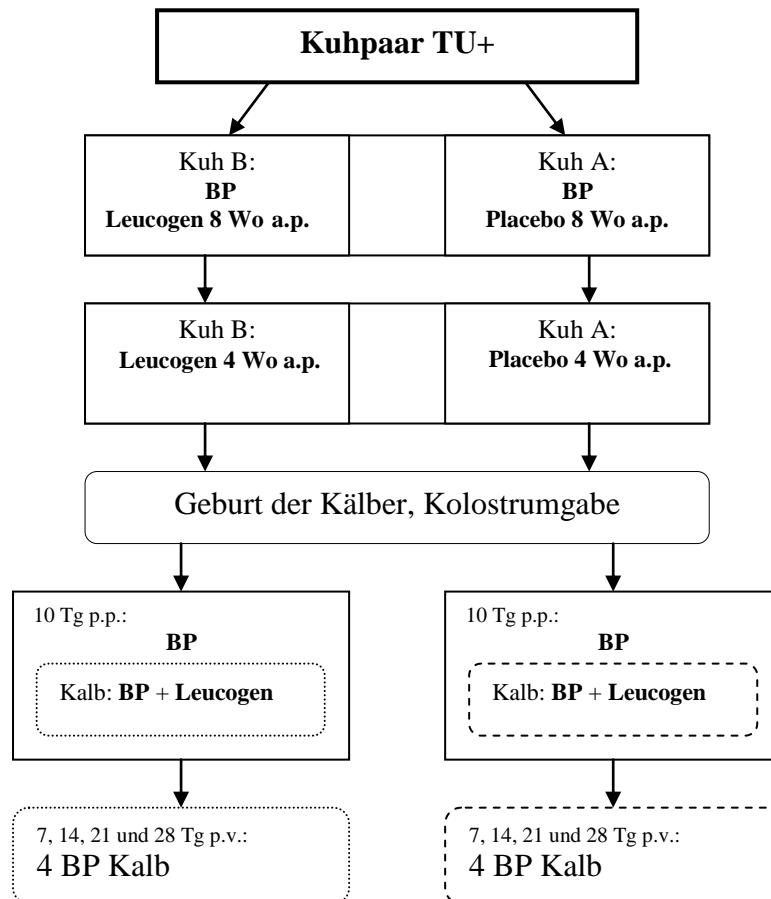


Abbildung 1: Flussdiagramm des Versuches

5.2. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden bei 40 Kühen und ihren Kälbern durchgeführt, wobei 25 Kühe der Rasse Braunvieh, 8 Kühe der Rasse Red Holstein, 5 Kühe der Rasse Holstein und 2 Fleckvieh-Kühe im Alter von 2½ bis 11 Jahren in den Versuch einfließen. Sie stammten aus insgesamt 15 Betrieben der ambulatorischen Klinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich und wurden dort zu 55% in Anbindehaltung und zu 45% in Freilaufställen gehalten. Alle Versuchstiere blieben während der gesamten Versuchsdauer auf den Bauernhöfen und wurden dort durch einen Tierarzt (ego ipso) vakziniert und beprobt.

Um die Einflüsse und Bias von Klima, Umgebung, Haltung, Fütterung und so weiter auf die Resultate der Untersuchungen zu minimieren, wurde das Modell der Kuhpaare (matched pair analysis) gewählt. Zwei aus demselben Betrieb stammende Tiere, die im Abstand von höchstens drei Tagen belegt worden waren, und von denen in der Folge zu erwarten war, dass sie ungefähr zur selben Zeit abkalben sollten, bildeten ein solches Paar. Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Kälber eines solchen Kuhpaares unter ähnlichen äusseren Bedingungen, sprich Witterung, Infektionsdruck und Gesundheitszustand der Herde, zur Welt kamen und die Resultate ihrer Untersuchungen direkt miteinander verglichen werden konnten.

Der Versuch fand in der Zeit zwischen dem 27. Mai 2005 (1. Impfung des ersten Kuhpaares) und dem 16. Dezember 2005 (5. und letzte Blutprobenentnahme beim zuletzt geborenen Kalb) statt.

Für die Verwendung von Versuchstieren lag vom kantonalen Veterinäramt Zürich die Bewilligung mit der Nummer 51/2005 vor. Der Versuchsleitende wie auch der Versuchsdurchführende erfüllten die Anforderungen der Verordnung über die Aus- und Weiterbildung des Fachpersonals für Tierversuche.

5.3. Vakzine und Placebo

Im Versuch wurde ein Antigen verwendet, welches in vivo bei Rindern nicht von Bedeutung und dennoch klar definiert ist und für das einfache, verfügbare Nachweismethoden bestehen. Es handelte sich beim Impfstoff um Leucogen®, der in der tierärztlichen Praxis zur aktiven Immunisierung von Katzen gegen die feline Leukose eingesetzt wird. Das eigentliche Antigen in diesen Vakzinen ist das Protein p45, ein Bestandteil des Glykoproteins gp70 aus der Hülle des Virus. Zur Gewinnung dieses Proteins wird die dafür kodierende Gensequenz der viralen Nukleinsäure im Genom von Colibazillen inkorporiert. Die daraus hervorgehenden, rekombinanten Bakterien werden vermehrt und synthetisieren p45 in grosser Menge. Eine Impfdosis Leucogen® (= 1ml) enthält mindestens 100µg des gereinigten p45-Moleküls, versetzt mit Aluminiumhydroxid als Adjuvans.

Zum Einsatz kamen im Versuch Impfdosen der Firma Virbac der Chargen 13F1 (02-2007) und 14S9 (03-2007), wobei die einzelnen Vakzinierungen bei der Kuh und beim Kalb jeweils intramuskulär am Hals vorgenommen wurden.

Der Vorteil von Leucogen® gegenüber anderen handelsüblichen Impfstoffen gegen Kälberkrankheiten bestand darin, dass unterschiedliche Durchseuchungsraten gegenüber diesen üblichen Kälberkrankheiten der verschiedenen, am Versuch partizipierenden Betriebe keinen Einfluss auf die Resultate der Untersuchungen hatten. Die Serumtiter der Versuchstiere gegen übliche Durchfall- oder Pneumonie-Erreger, wie auch die Titer der anderen Tiere in den entsprechenden Herden, sowie der variierende Infektionsdruck in den Versuchsställen tangierten die Immunisierung gegen das Impfantigen nicht.

Als Placebo gelangte Catosal® (Bayer AG Leverkusen, Chargen-Nr.: KP02V63; 02-2007) zum Einsatz, eine im Handel erhältliche, 10%ige Injektionslösung einer organischen Phosphorverbindung mit Zusatz von Vitamin B12, die der Anregung des Stoffwechsels dient. Das Produkt eignete sich dank seiner dem Leucogen® ähnlichen Farbe, der gleichen Viskosität und keiner zu erwartenden Reaktion des Empfängertieres in Bezug auf seine Immunität, aber auch bezüglich Unverträglichkeitsreaktionen bestens um den Versuch geblindet durchzuführen. Dosen zu 1ml wurden dabei auf die gleiche Weise wie die Vakzine injiziert.

5.4. Probengewinnung und Lagerung

Die Blutproben der Kühe und ihrer Kälber wurden aus der Jugularvene entnommen. Dazu dienten evakuierte 5ml Serumglasröhrchen, sogenannte Vacutainer® (der Firma Becton Dickinson). Die Proben wurden in einer Kühlbox innerhalb der folgenden drei Stunden ins Labor transportiert, wo sie eine weitere halbe Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 10 Minuten bei 4800g zentrifugiert wurden. Das Serum wurde anschliessend abpipettiert und in Eppendorfröhrchen bei -18°C eingefroren. Für die Laboruntersuchungen wurden die Proben zu einem späteren Zeitpunkt (zwischen dem 11. Januar 2006 und dem 10. März 2006) bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, um die Kuh- respektive Kälber-Proben alle auf einmal unter identischen Bedingungen analysieren zu können (batch analysis).

Es wurden alle Proben in zweifacher Ausführung entnommen, verarbeitet und eingefroren. Traten unklare Resultate bei den ELISA-Tests auf, so wurde die Untersuchung mit der 2. Probe wiederholt.

5.5. Auswertung der Proben

Bei den folgenden Laboruntersuchungen ging es darum, die Antikörperkonzentrationen in den Seren der gewonnen Blutproben gegen FeLV mittels ELISA zu quantifizieren.

Der ELISA ist ein sehr empfindlicher Enzym-Immuntest. In diesem Falle wurde ein indirekter ELISA, die sogenannte „Sandwich-Technik“ zum Antikörpernachweis verwendet. Es handelt sich dabei um eine mehrstufige Reaktion, bei welcher das spezifische Antigen an die Festphase (Vertiefungen der Mikrotiterplatten) gebunden und dann das Serum zugegeben wird. Zum Antigen-Antikörper-Komplex wird ein Antiglobulin gegeben, das mit Enzym markiert wurde (auch Konjugat genannt). Nach Zusatz des Substrates wird aus der Extinktionsänderung die Antikörperkonzentration bestimmt (Kötsche 1991).

In vorliegendem Versuch diente das auf dem Markt erhältliche Peroxidase-konjugierte, AffiniPure Rabbit Anti-Bovine IgG als enzymmarkiertes Antiglobulin (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; Lot Number: 64130). Die Antikörper dieses Produktes reagieren mit den schweren Ketten von bovinem IgG und mit den leichten Ketten, die bei den meisten bovinen Immunglobulinen ähnlich sind. Das verwendete Substrat war ABTS (= 2,2' Azinodi(3-Ethylenbenzthiazoline Sulfonic Acid), von Sigma A-1888), das unter Zugabe von Zitronensäure bei pH 4.0 und mit 2%iger H₂O₂-Lösung eingesetzt wurde. Die photometrische Bestimmung des Substratumsatzes wurde bei einer Wellenlänge von 405nm mit einem ELISA-Reader (Dynex MRX, BioConcept) durchgeführt. Da der Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper Spezies-Homologie, Bovine, aufweist, musste mittels Negativ-Kontrolle der Waschprozess überwacht werden, damit nur spezifische Antikörper nachgewiesen wurden und nicht im Serum unspezifische bovine IgG.

In einem ersten Schritt mussten die für die Tests benötigten ELISA-Mikrotiterplatten mit FeLV-Antigen beschichtet werden. In einem früher durchgeführten Versuch (Stadler 2002) hat sich gezeigt, dass sich das Coating mit 50ng pro Vertiefung besonders gut eignet. Zur Isolierung des Antigen-Proteins p45 wurde der gesamte Inhalt einer Leucogen®-Impfdose (Chargen-Nummer: 1836, 07-2007, total 100µg p45 gebunden an Al(OH)₃) in einem Eppendorfröhrchen 5 Minuten bei 10'000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 0.9% NaCl wieder gelöst. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Waschvorgang ein zweites Mal wiederholt. Das gewaschene Antigen wurde schliesslich in 0.5ml Coating Buffer und 25µl 10% SDS-Lösung 5 Minuten bei 95°C gekocht, später mit Coating Buffer auf 200ml verdünnt und jedes einzelne Loch der ELISA-Platte mit 100µl des verdünnten Antigens beschichtet. Die so vorbereiteten Platten wurden drei Stunden bei 37°C inkubiert, über Nacht im Kühlschrank abgekühlt und nach abdecken mit Parafilm bei -18°C bis zur endgültigen Verwendung eingefroren.

In einem zweiten Schritt wurden die verschiedenen Reagenzien hergestellt. Die ELISA-Waschlösung bestand aus 87.66g NaCl + 5ml Tween 20 verdünnt auf ein Liter mit H₂O. Diese wurde zum Gebrauch nochmals 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt. Die Zitronensäure (15.75 g Zitronensäure Monohydrat, Fluka, Art. 27490) wurde unter Zugabe von H₂O und 10 normaler Natronlauge gelöst und auf pH 4 eingestellt. Die fertige Zitronensäure wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der lichtempfindlichen ABTS-Stocklösung wurden 22 mg des oben erwähnten Farbstoffes in Form von Diammonium Salz pro 1ml H₂O verwendet und die fertige Lösung mit Alufolie umwickelt ebenfalls im Kühlschrank gelagert. Das gefriergetrocknete Pulver des Konjugats wurde in 1.5ml H₂O bidest. aufgelöst und zwecks Haltbarkeit mit 1.5ml Glycerin (Fluka, Art. 49782) gemischt. Aliquots von 20µl wurden in Eppendorfröhrchen bei -18°C eingefroren. Im Versuch wurden diese Aliquots bei Raumtemperatur aufgetaut und mit PBS („Salzpuffer“: KH₂PO₄, KCl, Na₂HPO₄ + H₂O, NaCl, NaN₃ + H₂O tridest.) verdünnt eingesetzt.

Wie bereits kurz erwähnt, wurden die Bedingungen für den FeLV-ELISA im Rahmen einer früheren Arbeit (Stadler 2002) etabliert. Da die Kälber jenes früheren Versuchs nur passiv mit kolostralen Antikörpern versorgt, und nicht, wie im aktuellen Versuch, auch aktiv immunisiert wurden, mussten in einer Reihe von Vorversuchen die idealen neuen Testbedingungen bestimmt werden.

Ein erster Vorversuch war nötig, um herauszufinden, welche Kühe der Kuhpaare geimpft und welche mit dem Placebo gespritzt wurden. Dazu wurde eine erste ELISA-Platte mit den Seren von 5 Kuhpaaren beimpft. Als Positiv-Kontrolle wurde das Serum der mit Leucogen® hyperimmunisierten Kuh „Furka“ aus der oben erwähnten Dissertation mitgeführt. Bereits von Auge war ersichtlich, dass die B-Kühe der Kuhpaare den Impfstoff erhalten hatten und die A-Kühe das Placebo.

Durch einen zweiten Vorversuch mit den Seren der verschiedenen geimpften Kühe liess sich jene Kuh eruieren, die den höchsten postvazinalen Antikörpertiter zeigte (Kuh B des Paares 13). Er war sogar höher als jener der Kuh „Furka“ und wurde fortan als Positivprobe und Kontrolle in den weiteren Ansätzen jeweils zu Beginn, in der Mitte und am Schluss mitgeführt.

Die sich ebenfalls noch leicht verfärbende Probe der anfänglich gewählten Negativ-Kontrolle, bestehend aus Serum von 10, vom Versuch unabhängigen gepoolten Kühen, führte bei den Messungen zu vielen negativen Konzentrationswerten. An seiner Stelle wurde während der Hauptversuche das Serum der Kuh B aus dem 8. Versuchspaar (nach Impfung!) eingesetzt, das einen der tiefsten Extinktionswerte aufwies. Diese Kuh zeigte keine Reaktion auf die Impfung mit dem Antigen.

Im dritten Vorversuch wurden die Messungen der Seren mit Verdünnungsreihen von 1:100 bis 1:1600 durchgeführt. Verdünnt wurden die Seren mit Puffer 3X (=P3X, bestehend aus 8.7g 0.15M NaCl, 372mg 1mM Titriplex III, 6.05g 0.05M Tris-base, 1g 0.1% Bovines Serum-Albumin, 1ml 0.1% Tween 20; mit HCl auf pH 7.4 eingestellt und mit H₂O auf 1 Liter ergänzt). Gleichzeitig variierte das Zeitintervall von der Substratzugabe bis zur photometrischen Bestimmung der Extinktionswerte zwischen 5 und 10 Minuten. Im vierten Vorversuch wurden erste Kälberseren unter den gleichen Bedingungen getestet.

Aufgrund von Sensitivitätsanalysen, wobei das Signal–Rauschen–Verhältnis optimiert wurde, wurden die idealen Verdünnungen bestimmt.

Für die Hauptversuche mit den Kuhseren zeigten sich folgende Bedingungen als am besten geeignet: Im Doppelansatz wurden die beschichteten ELISA-Platten mit den 1:600 verdünnten Proben beimpft und 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Das Konjugat wurde in der Verdünnung von 1:10'000 verwendet, die Platten nach dessen Zugabe wiederum 1 Stunde bei derselben Temperatur inkubiert und das Resultat 12 Minuten nach Zugabe des Substrates abgelesen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Platten standardmässig jeweils 3-mal gewaschen.

Für die Hauptversuche mit den Kälberseren galten die gleichen Bedingungen wie für die Kuhseren, mit den beiden Ausnahmen, dass diese im Verhältnis 1:100 mit P3X verdünnt wurden, und dass das Ablesen der Reaktion bereits 11 Minuten nach Zugabe des Substrates genauere Resultate ergab.

Nach den Hauptversuchen mit allen Kuh- und Kälberseren, zeigten sich in wenigen Fällen stark divergierende Doppelwerte oder unerwartete Antikörper-Konzentrations-Verläufe. Als ungenaue Messresultate galten bei den Kühen OD-Doppelwerte, deren Differenz mehr als 0.03 betrug, bei den Kälbern mehr als 0.1. Solche Werte wurden in Nachuntersuchungen unter gleichen Versuchsbedingungen nochmals bestimmt.

Von den gemessenen Extinktions-Doppelwerten wurde rechnerisch das arithmetische Mittel bestimmt (= OD Mittel). Mit Hilfe der ebenfalls gemessenen Werte für die Negativ- (= OD O) und die Positiv-Kontrolle (= OD 100) konnten somit die relativen Antikörper-Konzentrationen in Prozent nach der folgenden Formel berechnet werden:

$$\frac{\text{OD Mittel} - \text{OD O}}{\text{OD 100} - \text{OD O}} \times 100 = \text{relative Konzentration in \%}$$

Durch einfache Subtraktion wurden die Antikörper-Konzentrationsänderungen in Prozent ermittelt. Differenzen in der Konzentration von mehr als 3% galten bei den Kühen als Reagenten. Die 3% wurden auf Grund einer Zunahme von 2 Standardabweichungen innerhalb der nicht geimpften Kühe als Kriterium bestimmt, entsprechend einer statistischen z-Transformation für $P \leq 0.05$ ($z: 2.0 > 1.96$).

5.6. Statistische Methoden

Zur Berechnung der Konzentrationen und Konzentrationsunterschiede wurden Excel-Datenbanken erstellt. Die statistischen Berechnungen der Mittelwerte, Standardabweichungen und Häufigkeitsverteilungen erfolgten mit Hilfe des Programms StatView 5.1 (SAS Corporation, Wangen, Schweiz). Zur Visualisierung wurden Flussdiagramme (Flowchart) erstellt. Die Daten wurden mittels Normality-test nach Shapiro–Wilk auf Gauss-Verteilung getestet. Es wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit wiederholten Messungen für Verlaufsmessungen durchgeführt. Effektmessungen wurden mittels zweiseitigem Student t-Test analysiert. Gruppenanalysen in Form von Reagenten–Nichtreagenten wurden mittels Chi-Quadrat-Test analysiert. Wenn Gruppen mit $n < 5$ vorlagen, wurde der Fisher's exact Test angewendet. Als Signifikanzschwelle wurde $p \leq 0.05$ angenommen. Eine Tendenz bestand für $0.05 < p < 0.2$.

6. Resultate

6.1. Definitive Versuchsbedingungen

Aufgrund der bei Versuchsbeginn vorliegenden Belegungsdaten, wurden die Kühe zu Versuchspaaren zusammengestellt (matched pair), mit der Absicht, dass sie möglichst zum gleichen Zeitpunkt und im gleichen Stall abkalben sollten. Mit einer Ausnahme lagen diese Belegungszeitpunkte maximal drei Tage auseinander. Bei der Kuh B des sechsten Versuchspaares wurde das Besamungsdatum falsch notiert, was dazu führte, dass die Kälber dieses Versuchspaares im Abstand von 44 Tagen zur Welt kamen. Bei den übrigen Kuhpaaren betrug die Differenz zwischen den beiden Abkalbezeitpunkten im Durchschnitt 6.20 ± 5.08 Tage. Wurde das sechste Kuhpaar trotzdem in die Berechnung mit einbezogen, so ergab sich eine durchschnittliche Zeitdifferenz von 8.10 ± 9.79 Tagen zwischen den Geburten der Kühe A und der Kühe B, wobei die Kühe der Gruppe A in 11 von 20 Fällen und die Kühe B in 7 der 20 Fälle zuerst kalbten. Bei Versuchspaar 7 und 10 kalbten die beiden Kühe jeweils am gleichen Tag.

Die 40 Kühe gebaren während des Versuchs 39 lebende Kälber, 18 davon männlichen Geschlechts und 21 Kuhkälber. Bei Kuh A des 10. Versuchspaares entwickelte der Bauer nach leichter Zughilfe zwei tote, normal entwickelte, männliche Früchte. Die genaue Todesursache konnte laut Sektionsberichten des Institutes für Veterinärpathologie der Universität Zürich bei beiden abgestandenen Tieren nicht eruiert werden. Von den übrigen 39 Kälbern kamen 30 ohne jegliche Zughilfe entweder auf der Weide oder im Stall spontan zur Welt. Bei vier Kälbern (zwei männlichen und zwei weiblichen) war leichte Zughilfe nötig, bei einem grossen, männlichen Kalb musste starke Zughilfe geleistet werden (Kalb von Kuh A des Versuchspaares 12). Drei Kälber konnten nach Reposition einer Torsio uteri unter leichter Zughilfe extrahiert werden. Bei Kuh B des Versuchspaares 18 wurde nach einer Tragezeit von 9 Monaten und 16 Tagen wegen Klauenrehe die Geburt mit 20ml Dexamedium® (Intervet) und 2ml Prosolvin® (Intervet) eingeleitet. 48 Stunden später konnte das Kalb unter leichter Zughilfe entbunden werden.

37 der 39 Kälber nahmen gemäss Aufzeichnungen der Besitzer in den ersten 12 Lebensstunden mehr als zwei Liter Kolostrum auf. Das Kalb von Kuh A des Versuchspaares 15 nahm bis 12 Stunden nach der Geburt weniger als 2 Liter Kolostrum auf und ein anderes Kalb (von Kuh B aus Paar 12) trank kein Kolostrum in der vorgegebenen Zeit. Dieses aspirierte wenig Fruchtwasser bei der Geburt, zeigte klinische Anzeichen einer respiratorischen Azidose und auskultatorische Lungengeräusche. Es wurde direkt nach der Geburt ans Tierspital Zürich überwiesen und während fünf Tagen stationär behandelt (Infusion mit Braun'scher® Lösung und Acidosan® (Vétoquinol), zusätzlich B-Neuron® (Vétoquinol), Selen-E Vetag® (Veterinaria), Metacam® (Boehringer Ingelheim) und Engemycin® (Intervet)). Danach ging das Tier zurück in den Betrieb und zeigte während der restlichen Versuchsdauer keine weiteren Anzeichen einer Erkrankung.

Drei Kälber litten während der Versuchsdauer in der Zeit zwischen dem 17. und dem 31. Tag post natum jeweils für kurze Zeit an einer leichtgradigen Bronchopneumonie und wurden standardmässig mit Antiphlogistika und Antibiotika behandelt. Sieben Kälber im Alter zwischen 5 und 17 Tagen zeigten eine leichtgradige Enteritis (nicht weiter abgeklärter Ätiologie), wobei vier von ihnen einer Behandlung bedurften. Ein Kalb kam mit einem Nabelbruch zur Welt. Es wurde nach anfänglich konservativem Therapieversuch im Alter von einem Monat (zwischen der 4. und der 5. Blutentnahme) im Stall operiert und anschliessend für vier Tage prophylaktisch mit Antibiotika versorgt. Schliesslich erkrankten drei Tiere zwischen 14 und 20 Tagen post natum an einer Omphalitis. Sie wurden alle mit Synulox® (Pfizer) behandelt. Eines dieser Tiere (Kalb von Kuh A aus Paar 12, siehe auch starke Zughilfe) starb drei Wochen post natum, gemäss Sektionsbericht ohne klare Todesursache, jedoch mit dem Hinweis auf eine Sepsis. Die restlichen 24 Kälber waren während der gesamten Versuchsdauer gesund.

Alle Kälber zeigten 10 Tage post natum, also zum Zeitpunkt der Leucogen® - Impfung, keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung.

Für die verbleibenden Auswertungen des Tierversuchs standen folglich die Resultate der 40 Kühe und der 20 Kälber aus Gruppe B (Impfgruppe) sowie der 18 Kälber aus Gruppe A (Placebogruppe) zur Verfügung.

6.2. Verdünnung der Testseren

Im 3. Vorversuch wurde mittels Sensitivitätsanalysen die idealste Verdünnung der Kuhseren bestimmt. Die für die Kuhpaare 1, 6, 11 und 13 im Doppelansatz gemessenen und gemittelten OD-Werte der Proben 10 Tage nach dem Abkalben dienten als Grundlage für die Berechnungen. Sie wurden für die Verdünnungen 1:100 bis 1:1600 und für die Substratumsatz-Zeiten von 5, 8 und 10 Minuten bestimmt. Die folgenden drei Graphiken zeigen beispielhaft jeweils den Verlauf der Kurven für die OD-Werte von Kuh A und Kuh B des Versuchspaares 13 zu den drei gegebenen Messzeitpunkten (Abbildungen 2 – 4).

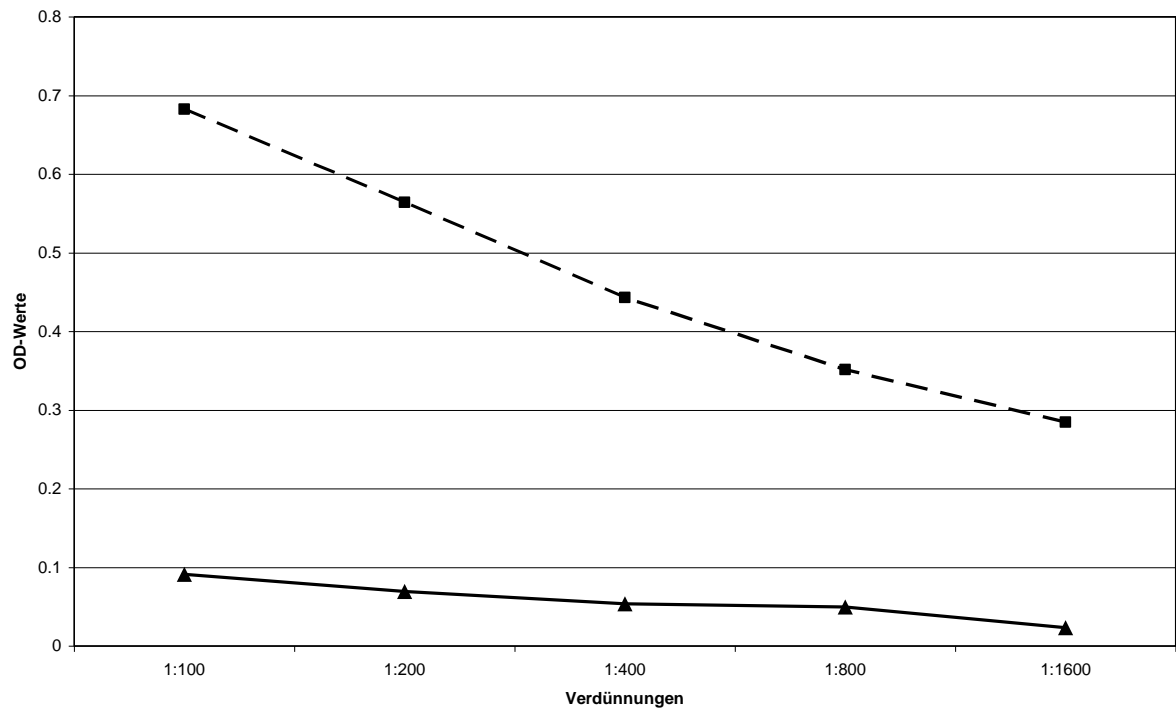


Abb. 2: Resultate aus dem 3. Vorversuch. Extinktionswerte (OD-Werte) der Seren 10 Tage post partum für Kuh A (—▲—) und Kuh B (--■--) des 13. Versuchspaares zu den Serumverdünnungen 1:100 bis 1:1600. Substratumsatzzeit: 5 Minuten.

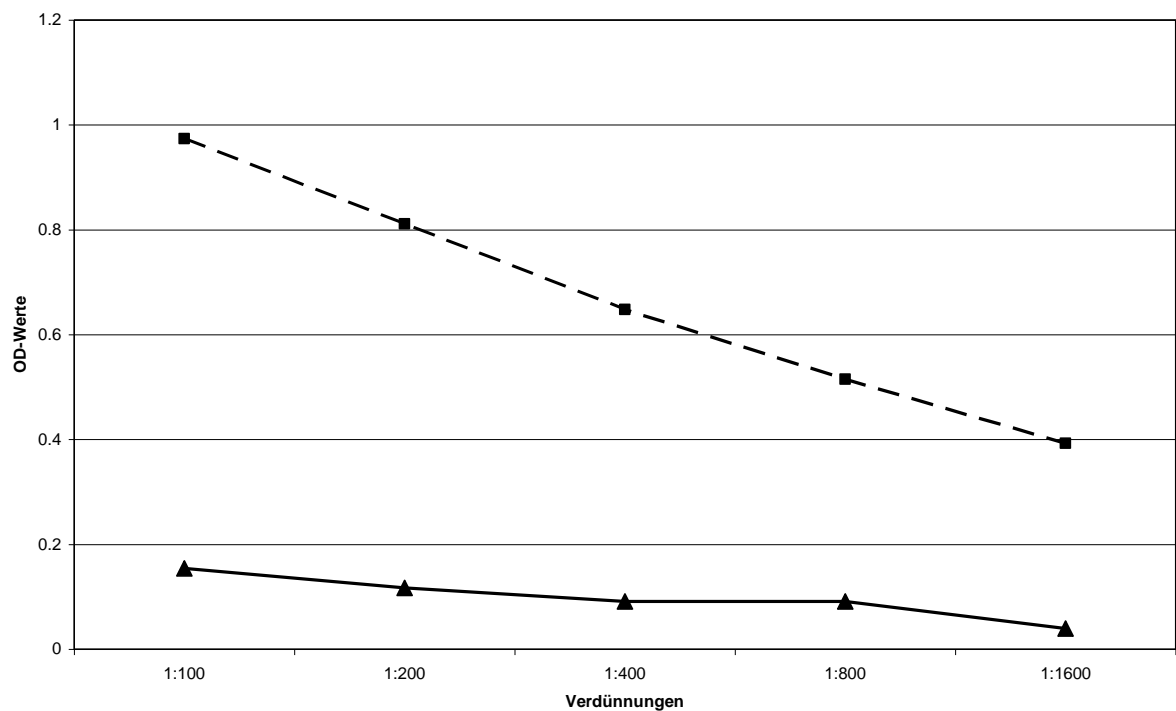


Abb. 3: Resultate aus dem 3. Vorversuch. Extinktionswerte (OD-Werte) der Seren 10 Tage post partum für Kuh A (—▲—) und Kuh B (--■--) des 13. Versuchspaares zu den Serumverdünnungen 1:100 bis 1:1600. Substratumsatzzeit: 8 Minuten.

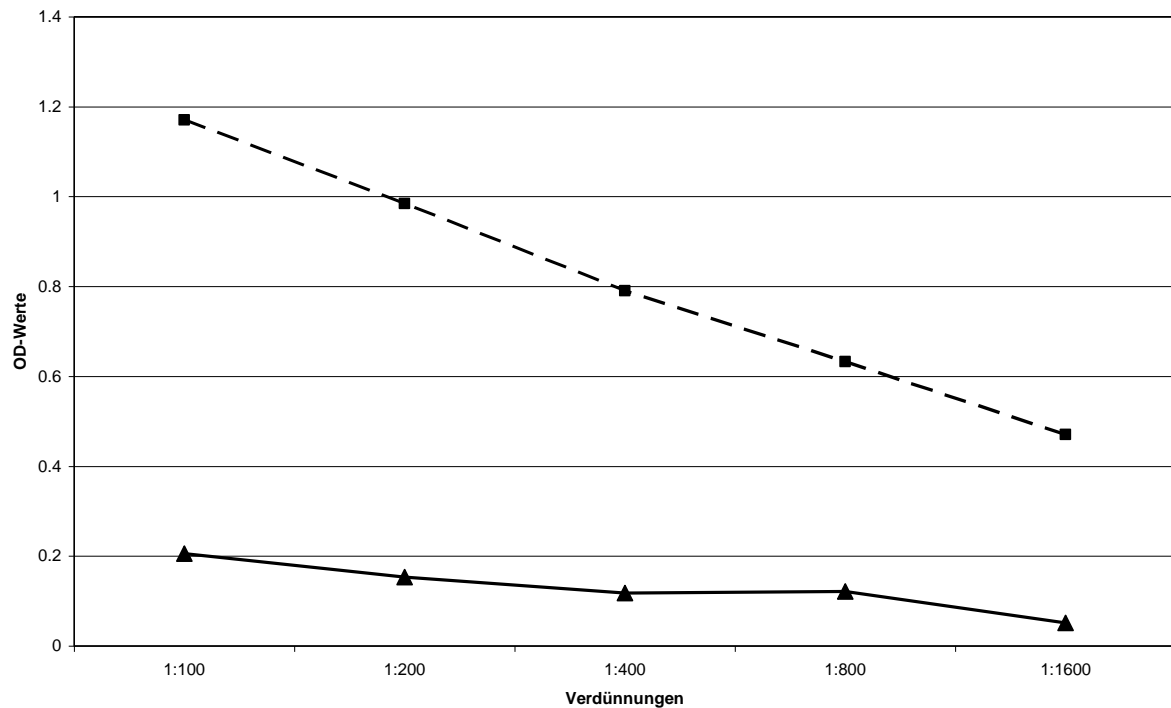


Abb. 4: Resultate aus dem 3. Vorversuch. Extinktionswerte (OD-Werte) der Seren 10 Tage post partum für Kuh A (—▲—) und Kuh B (--■--) des 13. Versuchspaares zu den Serumverdünnungen 1:100 bis 1:1600. Substratumsatzzeit: 10 Minuten.

Die ermittelten OD-Werte nahmen mit zunehmender Verdünnung ab. Die Werte für Kuh B waren generell höher als jene für Kuh A. Mit zunehmender Substratumsatz-Dauer nahmen die Werte generell zu. Auch Kuh A zeigte positive Extinktionswerte, die zum Beispiel bei einer Serumverdünnung von 1:200 zwischen 0.07 bei 5 Minuten und 0.15 bei 10 Minuten lagen. Auch für die Paare 1, 6 und 11 wurden die entsprechenden Graphiken erstellt.

Um das Signal-Rauschen-Verhältnis zu optimieren, galt es jene Verdünnung herauszufinden, bei der unabhängig vom Versuchspaar und vom Messzeitpunkt das kleinste Verhältnis von A zu B bestand. Dazu wurde in einem ersten Schritt der kleinere Wert A in Prozent des grösseren Wertes B ausgedrückt, für jedes Paar berechnet und dargestellt ($A/B \times 100$; Abbildungen 5 – 8).

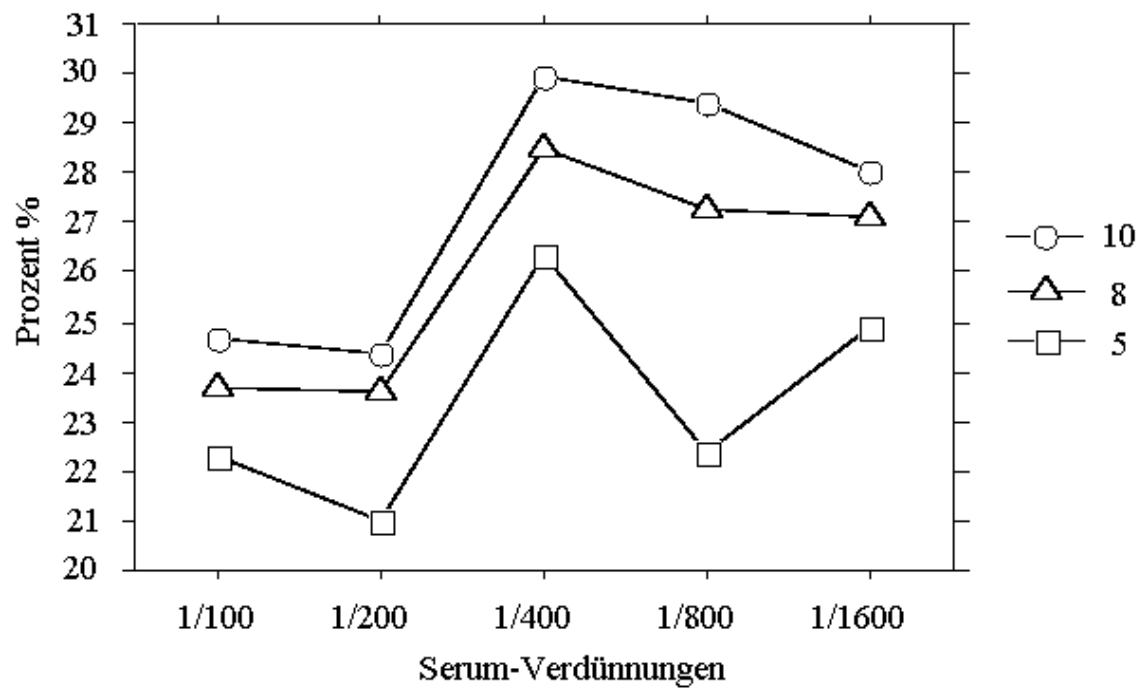


Abb. 5: Signal-Rauschen-Verhältnis für Kuhpaar 1 in Prozent ($A/B \times 100$) für die Substratumsatzzeiten von 5 (—□—), 8 (—△—) und 10 (—○—) Minuten und die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

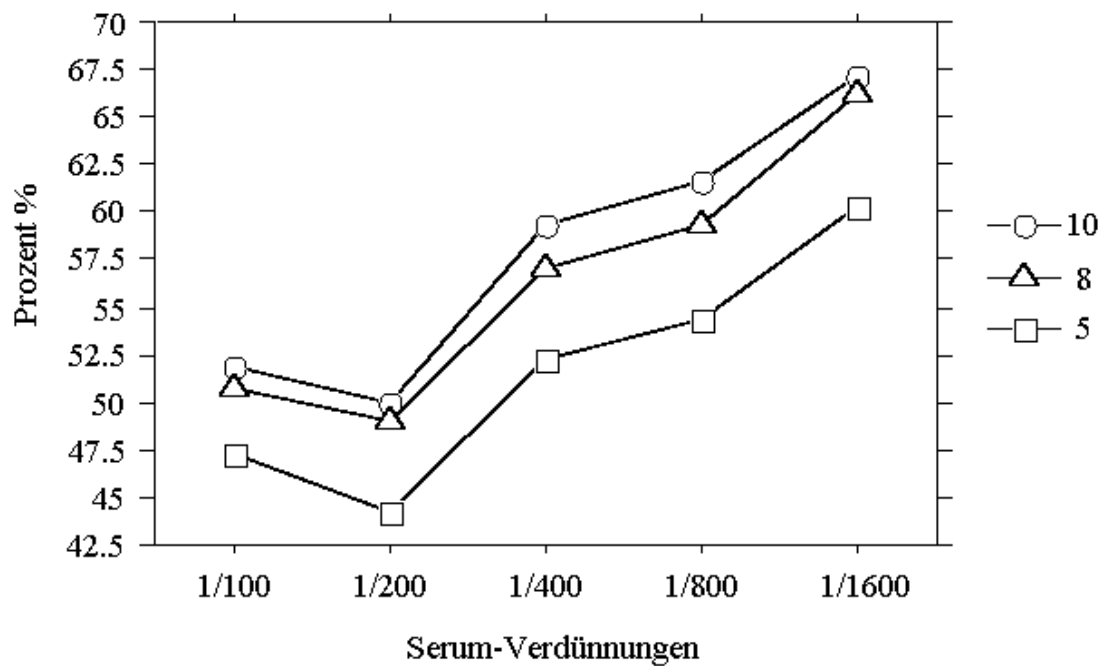


Abb. 6: Signal-Rauschen-Verhältnis für Kuhpaar 6 in Prozent ($A/B \times 100$) für die Substratumsatzzeiten von 5 (—□—), 8 (—△—) und 10 (—○—) Minuten und die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

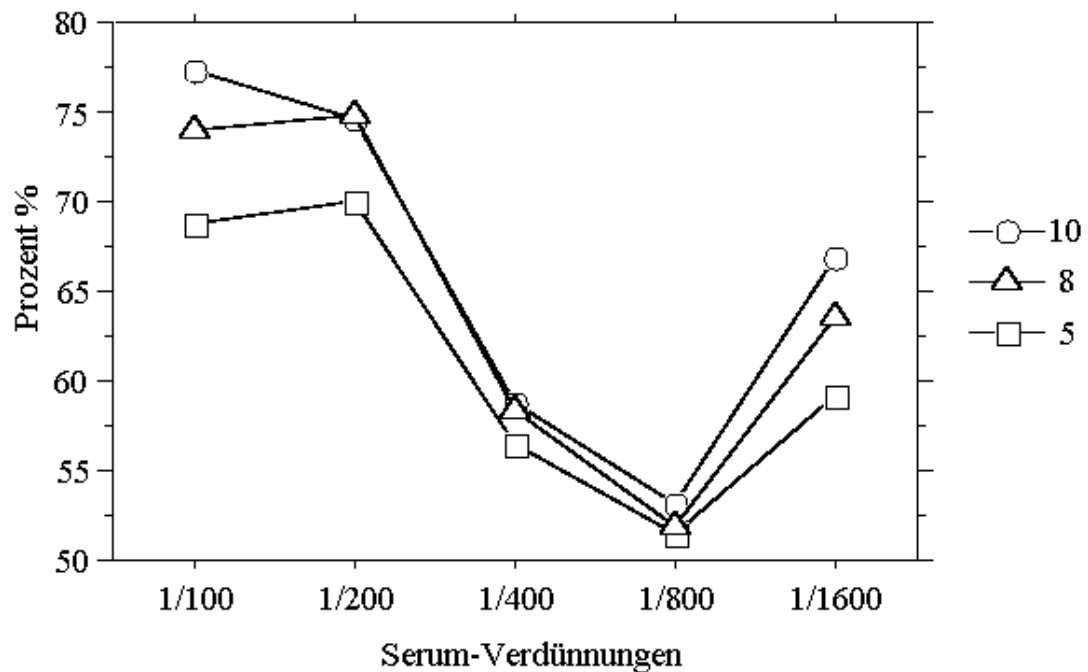


Abb. 7: Signal-Rauschen-Verhältnis für Kuhpaar 11 in Prozent ($A/B \times 100$) für die Substratumsatzzeiten von 5 (—□—), 8 (—△—) und 10 (—○—) Minuten und die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

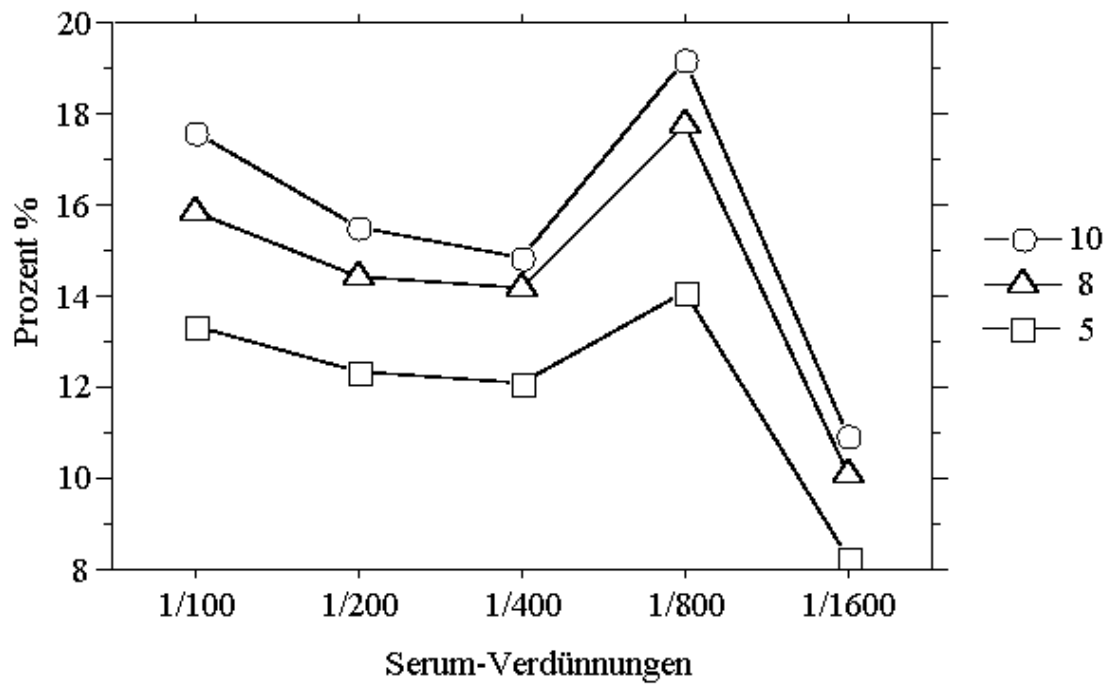


Abb. 8: Signal-Rausch-Verhältnis für Kuhpaar 13 in Prozent ($A/B \times 100$) für die Substratumsatzzeiten von 5 (—□—), 8 (—△—) und 10 (—○—) Minuten und die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

In einem zweiten Schritt wurden die Werte der 4 Kuhpaare gemittelt und wiederum als Kurven für die Messzeitpunkte 5, 8 und 10 Minuten in Abhängigkeit der Verdünnungsstufe aufgezeichnet (Abbildung 9).

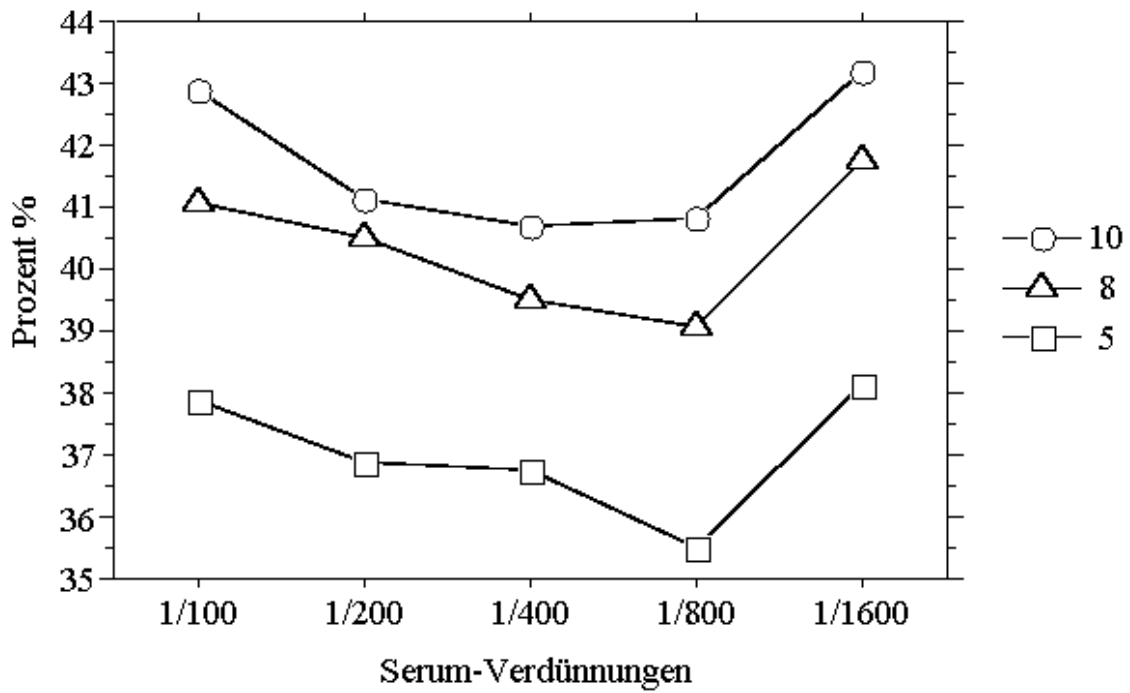


Abb. 9: Signal-Rauschen-Verhältnis in Prozent für die Kuhpaare 1, 6, 11 und 13 gemittelt (aus Abb. 5-8) für die Substratumsatzzeiten von 5 (—□—), 8 (—△—) und 10 (—○—) Minuten und die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

In einem dritten und letzten Schritt wurden diese drei Kurven zu einer zusammengefasst, indem zu jeder Verdünnung der Mittelwert bestimmt wurde (Abbildung 10).

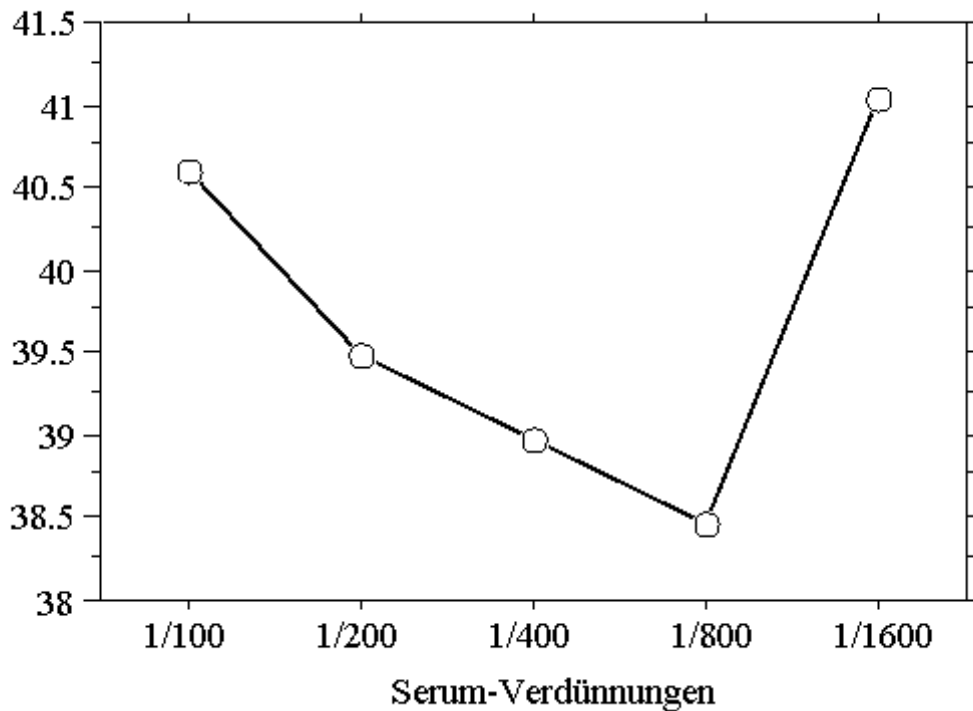


Abb. 10: Signal-Rauschen-Verhältnis in Prozent für die Kuhpaare 1, 6, 11 und 13 unabhängig von den Substratumsatzzeiten für die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600.

Der mittlere Wert von A im Verhältnis zu B in Prozent betrug demnach für die Verdünnungen 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1600 jeweils 40.6%, 39.5%, 39.0%, 38.5% und 41.0%. Der Graph fiel bis zu einer Verdünnung von 1:800 ab, um dann wieder steil anzusteigen. Das beste Signal-Rauschen-Verhältnis, unabhängig vom Versuchspaar und der Zeit des Substratumsatzes lag zwischen den Verdünnungen 1:400 und 1:800. Für den Versuch wurde eine Verdünnung der Kuhseren von 1:600 gewählt.

Nach demselben Prinzip wie für die Kuhseren wurde mit den Kälberseren der Paare 1, 2, 6 und 7 die Verdünnung mit dem besten Signal-Rauschen-Verhältnis ermittelt. Bei Verwendung der Kälberseren von Kalb A und Kalb B dieser vier Paare 10 Tage nach der Geburt konnten für die Verdünnungen von 1:100 bis 1:1600 folgende, ebenfalls von den Paaren und dem Messzeitpunkt unabhängige Werte für das Verhältnis A/B in Prozent errechnet werden: 38.8%, 41.9%, 46.8%, 63.2% und 95.8%. Der Graph dieser Funktion stieg steil an. Die Serumverdünnung von 1:100 war demnach für die weiteren Untersuchungen am besten geeignet.

6.3. Reaktionen der Kühe

Tabelle 1 zeigt zusammenfassend die gemessenen OD-Werte aus den Serumproben der einzelnen Kühe vor und nach der zweimaligen Impfung mit Leucogen® oder der Injektion des Placebos, sowie die daraus berechneten OD-Mittelwerte, die mittlere FeLV-Antikörper-Konzentration, ausgedrückt in Prozent des 100-Standards minus des 0-Standards, und die Konzentrationsänderungen zwischen den zwei Beprobungszeitpunkten. Diese Konzentrationsänderungen schwankten bei den nicht geimpften Tieren mit einer Standardabweichung $SD = \pm 2.38\%$ um den errechneten Mittelwert 0.1. Als Reagenten wurden Tiere betrachtet, deren Antikörper-Konzentrationszunahmen mehr als 3% betrugen.

Tab.1: Doppelt gemessene Extinktionswerte (= OD1; OD2), errechneter Extinktions-Mittelwert (= OD Mittel), errechnete mittlere relative Antikörper-Konzentration in % (= Konz. Mittel %) = $\{(OD \text{ Mittel} - OD 0)/(OD 100 - OD 0) \times 100\}$ und errechnete Zu- oder Abnahme der rel. Antikörper-Konzentration zwischen den zwei Beprobungszeitpunkten für alle Kühe (= Diff. Konz.). Substratumsatzzeit: 12 Minuten. 1B(0) steht für Kuh B des ersten Versuchspaares vor den Leucogen®-Impfungen. 1B(10) ist dieselbe Kuh, 10 Tage nach der Geburt ihres Kalbes, also nach erfolgter Grundimmunisierung. 1A(0) und 1A(10) ist die mit Placebo behandelte Kuh des gleichen Kuhpaares vor und nach den Injektionen. Bei Diff. Konz.> 3% ist das entsprechende Tier ein Reagent (= Reagent).

12 Min	OD1	OD2	OD Mittel	Konz. Mittel %	Diff. Konz.	Reagent
1A(0)	0.153	0.135	0.1440	1.6	0	nein
1A(10)	0.142	0.146	0.1440	1.6		
1B(0)	0.248	0.249	0.2485	15.6	18.2	ja
1B(10)	0.384	0.385	0.3845	33.8		
2A(0)	0.159	0.159	0.1590	3.6	-3.3	nein
2A(10)	0.133	0.135	0.1340	0.3		
2B(0)	0.124	0.123	0.1235	-1.1	2.0	nein
2B(10)	0.141	0.137	0.1390	0.9		
3A(0)	0.124	0.123	0.1235	-1.1	0.9	nein
3A(10)	0.121	0.140	0.1305	-0.2		
3B(0)	0.130	0.138	0.1340	0.3	-0.8	nein
3B(10)	0.129	0.128	0.1285	-0.5		
4A(0)	0.150	0.153	0.1515	2.6	0.7	nein
4A(10)	0.156	0.157	0.1565	3.3		
4B(0)	0.149	0.157	0.1530	2.8	0.4	nein
4B(10)	0.141	0.171	0.1560	3.2		
5A(0)	0.196	0.179	0.1875	7.3	2.4	nein
5A(10)	0.191	0.219	0.2050	9.7		
5B(0)	0.152	0.135	0.1435	1.2	-0.3	nein
5B(10)	0.143	0.140	0.1415	0.9		
6A(0)	0.168	0.191	0.1795	6.4	0.8	nein
6A(10)	0.171	0.200	0.1855	7.2		
6B(0)	0.117	0.114	0.1155	-2.7	10.0	ja
6B(10)	0.175	0.200	0.1875	7.3		
7A(0)	0.139	0.143	0.1410	1.2	-1.4	nein
7A(10)	0.119	0.142	0.1305	-0.2		
7B(0)	0.143	0.115	0.1290	-0.4	10.0	ja
7B(10)	0.196	0.211	0.2035	9.6		
8A(0)	0.122	0.124	0.1230	-1.7	2.8	nein
8A(10)	0.137	0.149	0.1430	1.1		
8B(0)	0.134	0.121	0.1275	-0.6	-1.9	nein
8B(10)	0.114	0.113	0.1135	-2.5		
9A(0)	0.129	0.143	0.1360	0.5	-1.9	nein
9A(10)	0.116	0.127	0.1215	-1.4		
9B(0)	0.154	0.130	0.1420	1.3	3.8	ja
9B(10)	0.176	0.164	0.1700	5.1		
10A(0)	0.145	0.152	0.1485	2.2	-2.1	nein
10A(10)	0.130	0.135	0.1325	0.1		
10B(0)	0.182	0.173	0.1775	6.1	-4.0	nein
10B(10)	0.140	0.156	0.1480	2.1		

Tab. 1 ff

11A(0)	0.171	0.174	0.1725	5.2		
11A(10)	0.171	0.171	0.1710	5.0	-0.2	nein
11B(0)	0.194	0.196	0.1950	8.2		
11B(10)	0.181	0.195	0.1880	7.3	-0.9	nein
12A(0)	0.183	0.189	0.1860	7.0		
12A(10)	0.189	0.186	0.1875	7.2	0.2	nein
12B(0)	0.143	0.142	0.1425	1.0		
12B(10)	0.119	0.143	0.1310	-0.6	-1.6	nein
13A(0)	0.128	0.115	0.1215	-1.5		
13A(10)	0.117	0.110	0.1135	-2.6	-1.1	nein
13B(0)	0.152	0.158	0.1550	2.9		
13B(10)	0.798	0.768	0.7830	85.9	83.0	ja
14A(0)	0.110	0.102	0.1060	-3.6		
14A(10)	0.094	0.088	0.0910	-5.5	-1.9	nein
14B(0)	0.192	0.184	0.1880	7.3		
14B(10)	0.120	0.127	0.1235	-1.3	-8.6	nein
15A(0)	0.124	0.136	0.1300	-0.4		
15A(10)	0.130	0.157	0.1435	1.4	1.8	nein
15B(0)	0.144	0.145	0.1445	1.5		
15B(10)	0.262	0.264	0.2630	17.2	15.7	ja
16A(0)	0.162	0.177	0.1695	4.8		
16A(10)	0.154	0.174	0.1640	4.1	-0.7	nein
16B(0)	0.144	0.138	0.1410	1.1		
16B(10)	0.141	0.137	0.1390	0.8	-0.3	nein
17A(0)	0.142	0.160	0.1510	2.4		
17A(10)	0.129	0.130	0.1295	-0.5	-2.9	nein
17B(0)	0.148	0.132	0.1400	0.9		
17B(10)	0.122	0.115	0.1185	-1.9	-2.8	nein
18A(0)	0.116	0.116	0.1160	-2.2		
18A(10)	0.129	0.142	0.1355	0.3	2.5	nein
18B(0)	0.175	0.146	0.1605	3.6		
18B(10)	0.151	0.148	0.1495	2.2	-1.4	nein
19A(0)	0.139	0.139	0.1390	0.8		
19A(10)	0.127	0.130	0.1285	-0.6	-1.4	nein
19B(0)	0.183	0.202	0.1925	8.0		
19B(10)	0.177	0.205	0.1910	7.8	-0.2	nein
20A(0)	0.135	0.108	0.1215	-1.9		
20A(10)	0.178	0.163	0.1705	4.9	6.8	ja
20B(0)	0.162	0.168	0.165	4.2		
20B(10)	0.109	0.134	0.1215	-1.9	-6.1	Nein

Sechs von 20 geimpften Kühen (= 30%) reagierten auf das Impfantigen von Leucogen®. Kuh 9B zeigte eine Konzentrationsänderung von 3.8%. Die Kühe 1B mit 18.2%, 6B und 7B mit je 10% sowie Kuh 15B mit 15.7% zeigten eine deutlichere Zunahme der Antikörperkonzentration. Die geimpfte Kuh des 13. Versuchspaares mit einer Konzentrationszunahme zwischen den beiden Beprobungszeitpunkten von 83% reagierte mit Abstand am deutlichsten. Die übrigen 14 geimpften Kühe galten gemäss dem gesetzten Grenzwert als Nichtreagenten. Zwei von ihnen, nämlich Kuh 2B und Kuh 4B zeigten Konzentrationszunahmen zwischen 0% und 3%. Bei den restlichen 12 geimpften Kühen sank die Antikörper-Konzentration im Intervall der Beprobung zwischen 0.2% und 8.6%, im Durchschnitt um 2.4%.

Bei den mit Placebo gespritzten Kühen waren 19 von 20 Tieren (= 95%) Nichtreagenten. Kuh 1A zeigte eine unveränderte Antikörper-Konzentration zwischen der ersten und der zweiten Beprobung. Acht dieser 19 Tiere zeigten eine geringgradige Zunahme der Antikörperkonzentration von 0.2% bis 2.8%, im Schnitt 1.5%. Bei den übrigen 10 dieser 19 Kühe nahm die Konzentration zwischen 0.2% und 3.3%, durchschnittlich um 1.7% ab. Bei einer nicht geimpften Kuh, der Kuh A des Versuchspaares 20, konnte eine Zunahme der relativen Antikörper-Konzentration von + 6.8% zwischen der ersten und der zweiten Probe gemessen werden.

6.4. Reaktionen der Kälber

Die gemessenen OD-Werte aus den gewonnenen Seren der Blutproben aller Kälber wurden, wie in der folgenden Tabelle 2 exemplarisch für die ersten drei Kälberpaare dargestellt, zusammengefasst. Die Extinktionswerte dienten als Grundlage für die weiteren Berechnungen der mittleren relativen FeLV-Antikörperkonzentrationen in Prozent sowie der Differenzen derselben, jeweils zwischen der ersten Probe vom Tag 10 post natum und den vier weiteren Proben der Tage 17, 24, 31 und 38 post natum. Zudem wurde die maximale Differenz der Konzentrationen in diesen Zusammenstellungen festgehalten. Sie diente als Argument, ob ein Kalb als Reagent galt oder als Nichtreagent.

Tab. 2: Doppelt gemessene Extinktionswerte (= OD1; OD2), errechneter Extinktions-Mittelwert (= OD Mittel), errechnete mittlere relative Antikörper-Konzentration in % (= Konz.Mittel% = (OD Mittel – OD 0)/(OD 100 – OD 0) x 100) und errechnete Zu- oder Abnahmen der rel. Antikörper-Konzentration zwischen Probe1 und Probe2 (= DKonz1), zwischen Probe1 und Probe3 (= DKonz2), zwischen Probe1 und Probe4 (= DKonz3) sowie zwischen Probe1 und Probe5 (= DKonz4) aller Kälber der ersten drei Versuchspaare. DKonz.max bedeutet grösste positive Konzentrationsdifferenz aus den vier vorher berechneten Konzentrationsdifferenzen. Substratumsatzzeit: 11 Minuten. 1A(10) steht für Kalb A des ersten Versuchspaares 10 Tage post natum (vor der Leucogen®-Impfung). Die Zahlen 17, 24, 31 und 38 in Klammern sind ebenfalls Tagesangaben post natum. 1B(10) ist das Kalb B des gleichen Versuchspaares 10 Tage nach Geburt.

11 Min	OD1	OD2	OD Mittel	Konz.Mittel%	DKonz1	DKonz2	DKonz3	DKonz4	DKonz.max
1A(10)	0.238	0.247	0.2425	-5.9	0.2	12.2	8.3	3.6	12.2
(17)	0.239	0.251	0.2450	-5.7					
(24)	0.376	0.391	0.3835	6.3					
(31)	0.331	0.346	0.3385	2.4					
(38)	0.282	0.287	0.2845	-2.3					
1B(10)	0.918	0.943	0.9305	53.6	-3.4	-1	-7.3	-13.3	negativ
(17)	0.886	0.896	0.8910	50.2					
(24)	0.915	0.923	0.9190	52.6					
(31)	0.830	0.862	0.8460	46.3					
(38)	0.751	0.803	0.7770	40.3					
2A(10)	0.214	0.217	0.2155	-8.3	5.3	47.7	46.3	47	47.7
(17)	0.280	0.273	0.2765	-3.0					
(24)	0.775	0.756	0.7655	39.4					
(31)	0.719	0.780	0.7495	38.0					
(38)	0.767	0.748	0.7575	38.7					
2B(10)	0.487	0.488	0.4875	15.3	-6.3	5.7	5.6	-0.4	5.7
(17)	0.411	0.418	0.4145	9.0					
(24)	0.532	0.574	0.5530	21.0					
(31)	0.563	0.541	0.5520	20.9					
(38)	0.499	0.467	0.4830	14.9					
3A(10)	0.210	0.242	0.2260	-7.4	10.8	50.3	41.3	39.2	50.3
(17)	0.336	0.364	0.3500	3.4					
(24)	0.830	0.784	0.8070	42.9					
(31)	0.706	0.698	0.7020	33.9					
(38)	0.664	0.693	0.6785	31.8					
3B(10)	0.841	0.929	0.8850	49.7	-5.9	-19.4	-25.9	-29.1	negativ
(17)	0.851	0.783	0.8170	43.8					
(24)	0.659	0.662	0.6605	30.3					
(31)	0.576	0.596	0.5860	23.8					
(38)	0.528	0.571	0.5495	20.6					

An diesen Beispielen bereits ersichtlich war, dass die drei Kälber 1A, 2A und 3A, drei Tiere von mit Placebo behandelten Müttern, anfänglich negative mittlere FeLV-Serumkonzentrationen von -5.9%, -8.3% sowie -7.4% aufwiesen. Diese Werte stiegen mit der Zeit bei den drei Kälbern unterschiedlich stark an und erreichten bei allen Tieren 14 Tage nach der Leucogen®-Impfung (am Tag 24 post natum) ihre Maxima von 6.3%, 39.4% sowie 42.9%. Danach fielen sie wieder ab. Die maximalen Konzentrationszunahmen betrugen in diesen drei Fällen 12.2% für Kalb 1A, 47.7% für Kalb 2A sowie 50.3% für Kalb 3A.

Die drei Kälber der mit Leucogen® geimpften Kühe (1B, 2B und 3B) zeigten bereits 10 Tage post natum, noch vor ihrer eigenen Impfung, unterschiedlich hohe, positive, mittlere relative Antikörperkonzentrationen gegen FeLV von 53.6%, 15.3% und 49.7%. Diese Werte nahmen in den Fällen von Kalb 1B und Kalb 3B auch nach der eigenen Impfung im weiteren Verlauf des Versuches nur ab. Sie sanken auf 40.3% respektive 20.6%. Kalb 2B zeigte im Unterschied zu den Kälbern 1B und 3B einen anderen zeitlichen Verlauf der mittleren Antikörperkonzentration. Ausgehend vom Wert 15.3%, der zwischen den Werten der A-Tiere und jenen von 1B und 3B lag, glich dieser Verlauf eher dem der A-Kälber. Er fiel zwar anfänglich leicht ab, stieg aber später auf den Höchstwert von 21%, was einer maximalen Zunahme von 5.7% betrug. Im Anschluss fiel er wieder leicht ab bis ungefähr auf das Ausgangsniveau. Der Maximalwert wurde ebenfalls 24 Tage post natum (= 14 Tage post vaccinationem) gemessen.

Die in der Folge durchgeführte Sensitivitätsanalyse mit unterschiedlich festgelegten Grenzwerten für die Aufnahme von Kolostrumantikörpern durch die Kälber (>4% respektive >10%) sowie für die Serumkonversion der Kälber nach eigener Impfung (>5%, >8% oder >10%) diente der Bestimmung der optimalen Trennung der einzelnen Gruppen (Tabelle 3).

Tab. 3: Sensitivitätsanalyse der Resultate der Kälber anhand unterschiedlicher Grenzwerte für die Aufnahme von Kolostrumantikörpern durch das Kalb (= Kolo-AK Kb) sowie unterschiedlicher Grenzwerte für die Serumkonversion des Kalbes (= Konversion Kb); delta>n% = Antikörperkonzentrations-Steigerung von mehr als n% für das entsprechende Kalb während der Versuchszeit. 1A = Versuchstiere A des Versuchspaares 1.

Kuh	Reaktion Kuh (delta>3%)	Kolo-AK Kb (>4%)	Kolo-AK Kb (>10%)	Konversion Kb (delta>5%)	Konversion Kb (delta>8%)	Konversion Kb (delta>10%)
1A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
1B	Ja	ja	ja	nein	nein	nein
2A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
2B	Nein	ja	ja	ja	nein	nein
3A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
3B	Nein	ja	ja	nein	nein	nein
4A	Nein	nein	nein	ja	ja	nein
4B	Nein	ja	ja	ja	ja	ja
5A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
5B	Nein	ja	nein	ja	ja	ja
6A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
6B	Ja	ja	nein	ja	ja	ja
7A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
7B	Ja	ja	ja	nein	nein	nein
8A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
8B	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
9A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
9B	Ja	ja	ja	ja	ja	nein
10A	Nein					
10B	Nein	nein	nein	ja	nein	nein
11A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
11B	Nein	nein	nein	nein	nein	nein
12A	Nein	nein	nein			
12B	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
13A	Nein	nein	nein	ja	nein	nein
13B	Ja	ja	ja	nein	nein	nein
14A	Nein	nein	nein	ja	ja	ja
14B	Nein	ja	ja	ja	nein	nein
15A	nein	nein	nein	ja	ja	ja
15B	ja	ja	ja	nein	nein	nein
16A	nein	nein	nein	ja	ja	ja
16B	nein	nein	nein	ja	ja	ja
17A	nein	ja	ja	nein	nein	nein
17B	nein	ja	nein	nein	nein	nein
18A	nein	nein	nein	nein	nein	nein
18B	nein	nein	nein	nein	nein	nein
19A	nein	nein	nein	nein	nein	nein
19B	nein	ja	ja	ja	ja	ja
20A	ja	nein	nein	ja	ja	ja
20B	nein	nein	nein	ja	ja	ja

Einzelne Tiere, wie das vorhin bereits im Detail betrachtete Kalb 2B, galten je nach angewandtem Grenzwert für die Konversion als Reagent (bei einer Konzentrationszunahme von $>5\%$) oder aber als Nichtreagent (bei den Grenzwerten $>8\%$ und $>10\%$). Dasselbe ergab sich auch bei den Kälbern 10B oder Kalb 13A und Kalb 14B. Sie galten nur als Reagenten bei der Annahme des Grenzwertes für die Konversion von $>5\%$. Die Kälber 4A und 9B mit maximalen Konzentrationsänderungen von 8.1% respektive 8.5% galten als Reagenten bei Festlegung des Grenzwertes von $>5\%$ oder $>8\%$. Bei Festlegung des Grenzwertes bei $>10\%$ fielen sie der Gruppe der Nichtreagenten zu.

Es existierten zudem drei Kälber, die je nach angewendetem Grenzwert für die passive Versorgung von Kolostrumantikörpern einer anderen Gruppe zufielen. Die Kälber 5B, 6B und 17B galten als Empfänger von maternalen Antikörpern, wenn der Grenzwert für die mittleren Antikörperkonzentrationen am 10. Tag post natum bei $+4\%$ angesetzt wurde. Beim höheren Grenzwert von $>10\%$ galten diese drei Tiere als Nichtempfänger.

Die Argumente der Kälber, die sich aufgrund dieser Sensitivitätsanalyse änderten, wurden zwecks vereinfachter Lesbarkeit in der Tabelle 3 in fester Schrift dargestellt.

Durch die Kombinationen dieser verschiedenen Grenzwerte ergaben sich sechs unterschiedliche Möglichkeiten der Einteilung der Kälber in die entsprechenden Gruppen (siehe kategorische Auswertung, Kapitel 4.5.). Gemäss Sensitivitätsanalyse ergab die Verwendung der Grenzwerte von $>4\%$ für die Kolostrum-Antikörper-Aufnahme und $>8\%$ für die Konversion der Kälber die beste Trennschärfe der Gruppen. Die folgenden statistischen Berechnungen basierten auf dieser sensitivitätsoptimierten Variante. Es flossen dabei die Daten aller B-Kälber sowie jene von 18 Kälbern der A-Gruppe ein. Kalb 10A und 12A fielen aus.

In Abbildung 11 sind die zeitlichen Verläufe der mittleren Antikörperkonzentrationen für die A-Kälber im Vergleich zu den Werten der B-Kälber dargestellt.

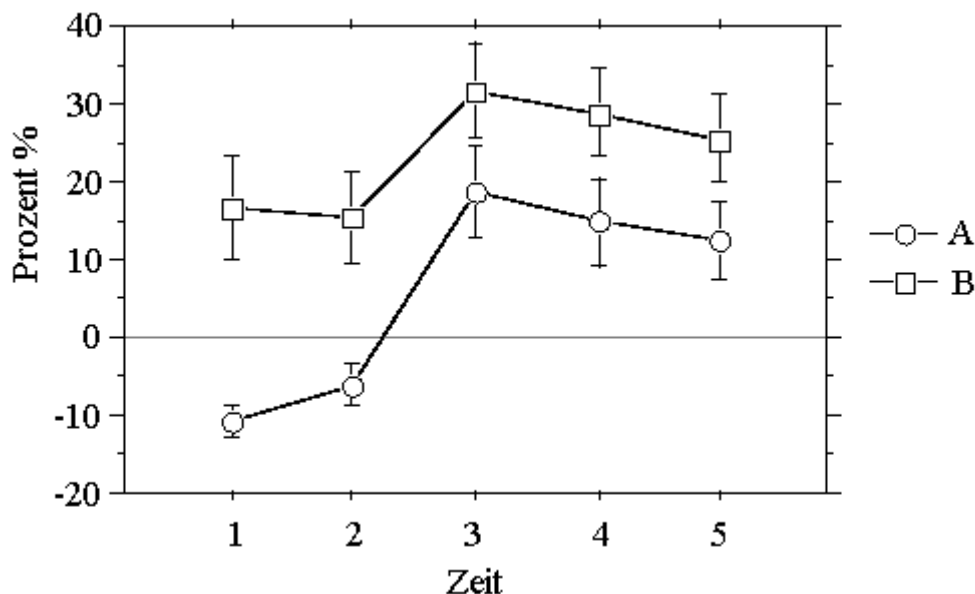


Abb. 11: Mittelwerte und Standard-Fehler der Antikörperkonzentrationen der A-Kälber ($-\circ-$) und der B-Kälber ($-\square-$) zu den entsprechenden Beprobungszeitpunkten 1 (= 10 Tage post natum {dpn}), 2 (= 17 dpn), 3 (= 24 dpn), 4 (= 31 dpn), 5 (= 38 dpn).

Die Kälber der mit Leucogen® geimpften Kühe der Gruppe B zeigten zu Beginn der Messreihe am 10. Tag post natum mit durchschnittlich $16.72 \pm 6.53\%$ eine deutlich höhere relative Antikörperkonzentration als die 18 Vergleichskälber der nicht geimpften Muttertiere, deren mittlerer Wert bei $-10.77 \pm 2.13\%$ lag. In der Folge fiel der mittlere Wert für die Konzentration bei der Gruppe B leichtgradig ab auf $15.25 \pm 5.86\%$ um dann zwischen Tag 7 und 14 post vaccinationem stark anzusteigen. Die Probe drei dieser Kälber zeigte am Tage 14 post vaccinationem durchschnittlich die höchsten Konzentrationen mit $31.87 \pm 5.97\%$. Über Probe vier ($28.86 \pm 5.68\%$) zu Probe fünf (25.54 ± 5.72) nahm der Wert der B-Kälber gegen Ende der Versuchsphase wieder ab.

Der Wert der Gruppe der A-Kälber nahm zwischen der ersten und der dritten Probe stetig zu. Erst steigerte er sich vom oben erwähnten Ausgangswert in der ersten Woche auf $-6.20 \pm 2.67\%$. In der zweiten Woche war die Zunahme stärker. Die Kurve erreichte ebenfalls am 14. Tag post vaccinationem auf dem Niveau von $18.64 \pm 5.85\%$ ihren höchsten Punkt. In den folgenden zwei Wochen sank der durchschnittliche Wert über $14.91 \pm 5.63\%$ (Probe 4) auf $12.46 \pm 5.12\%$ (Probe 5) ab.

Die Tiere der Gruppe B starteten am 10. Tag post natum also mit durchschnittlich höherem Wert als die Tiere der Gruppe A und zeigten auch 14 Tage post vaccinationem die höheren Antikörperkonzentrationen als diese. Der Unterschied zwischen den Gruppen A und B über die ganze Versuchsdauer war signifikant ($P=0.0107$). Die einzelnen Konzentrationen unterschieden sich hoch signifikant ($P<0.0001$) voneinander. Für die Unterschiede der einzelnen Konzentrationsmittelwerte der zwei Gruppen bestand eine deutliche Tendenz ($P=0.0609$).

23 Kälber hatten bei dem festgelegten Grenzwert von $>8\%$ nach ihrer eigenen Impfung konvertiert. 14 dieser Kälber stammten von nicht geimpften und neun von geimpften Kühen. Die restlichen 15 Kälber, davon elf von geimpften Kühen, konvertierten nach der eigenen Impfung nicht. Im Folgenden wurden die Konzentrationsverläufe dieser beiden Gruppen verglichen (Abbildung 12).

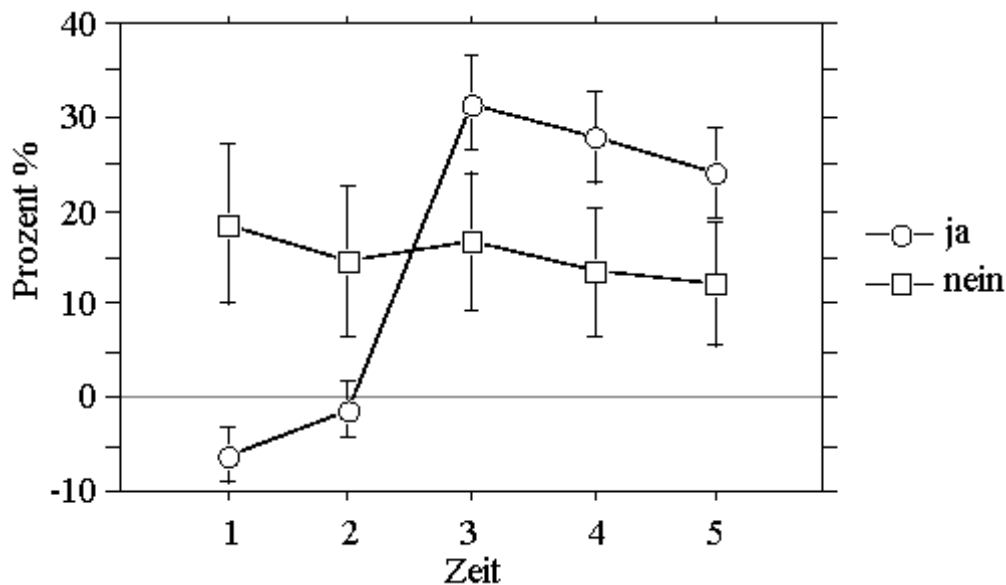


Abb. 12: Mittelwerte und Standard-Fehler der Antikörperkonzentrationen der Kälber, die konvertierten (—○—) und der Kälber, die nicht konvertierten (—□—) zu den entsprechenden Beprobungszeitpunkten 1 (= 10 Tage post natum {dpn}), 2 (= 17 dpn), 3 (= 24 dpn), 4 (= 31 dpn), 5 (= 38 dpn).

Die Kälber, die nach ihrer Impfung konvertierten, wiesen anfänglich eine Antikörperkonzentration von durchschnittlich $-6.04 \pm 2.86\%$ auf. Dieser Wert stieg in der ersten Woche nach der Impfung langsam auf $-1.17 \pm 2.83\%$ an und schnellte dann in die Höhe. Er betrug nach 14 Tagen $31.44 \pm 5.00\%$. Nach Erreichen dieses Maximums sank er in der dritten und vierten Woche post vaccinationem langsam wieder ab. Die Werte der vierten und der fünften Probe betrugen durchschnittlich $27.90 \pm 4.92\%$ und $23.95 \pm 4.85\%$. Ganz anders verliefen die durchschnittlichen mittleren Antikörperkonzentrationen der Kälber, die nicht konvertierten. Ihr Wert lag zu Beginn der Messreihe bei $18.63 \pm 8.47\%$. Dieser nahm im weiteren Verlauf des Versuches mit geringen Schwankungen ab, um schliesslich nach vier Wochen $12.29 \pm 6.53\%$ zu betragen. Die einzelnen Konzentrationen, unabhängig aber auch in Abhängigkeit der Gruppen konvertiert/nicht konvertiert unterschieden sich hoch signifikant voneinander ($P < 0.0001$).

Eine etwas differenziertere Betrachtung erlaubte zudem die Unterteilung der konvertierten und der nicht konvertierten Tiere in die ursprünglichen Gruppen A und B (Abbildung 13).

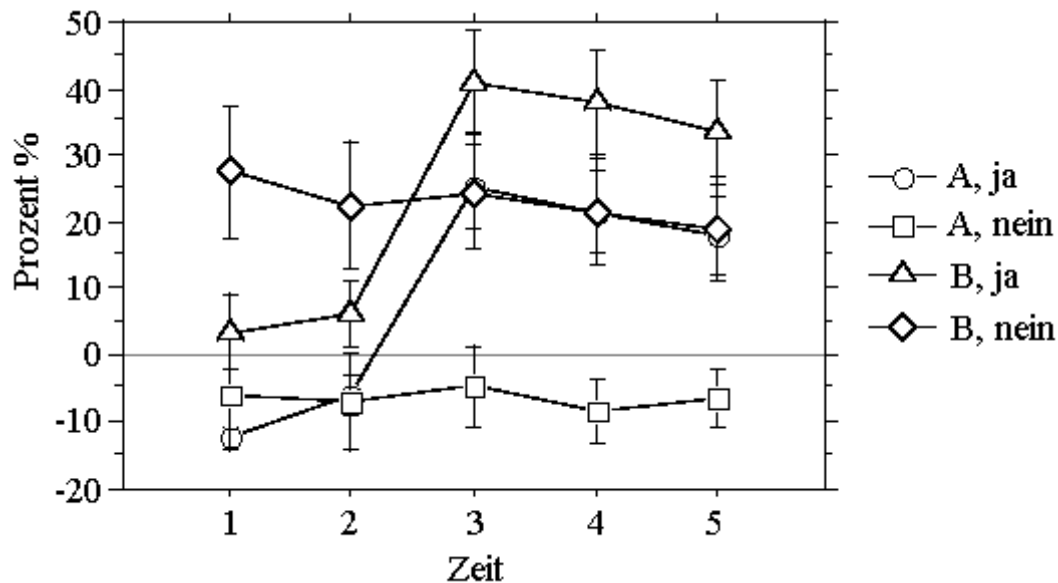


Abb. 13: Mittelwerte und Standard-Fehler der Antikörperkonzentrationen der A-Kälber, die konvertierten (= A, ja; -○-), der A-Kälber, die nicht konvertierten (= A, nein; -□-), der B-Kälber, die konvertierten (= B, ja; -△-) und der B-Kälber, die nicht konvertierten (= B, nein; -◇-) zu den entsprechenden Beprobungszeitpunkten 1 (= 10 Tage post natum {dpn}), 2 (= 17 dpn), 3 (= 24 dpn), 4 (= 31 dpn), 5 (= 38 dpn).

Die mittleren Werte der vier Tiere der Gruppe A, die nicht konvertierten, bewegten sich mit geringen Schwankungen zwischen $-4.65 \pm 6.00\%$ und $-8.25 \pm 4.92\%$ auf tiefem Niveau. Demgegenüber stieg der Wert der 14 Tiere der Gruppe A, die konvertierten von $-12.18 \pm 1.51\%$ in der ersten Woche langsam auf $-6.01 \pm 2.88\%$ und in der zweiten Woche schneller auf $25.30 \pm 6.31\%$. Im Anschluss fiel er langsam über $21.52 \pm 6.05\%$ am Tag 31 bis auf $17.80 \pm 5.74\%$ am Tag 38 ab.

Die elf Kälber der Gruppe B, die nicht konvertierten, zeigten anfangs einen höheren Wert als die entsprechenden Kälber der Gruppe A, im Durchschnitt $27.53 \pm 9.98\%$. Es war dies die Gruppe mit der höchsten mittleren Antikörperkonzentration zu Beginn des Versuchs. Diese Tatsache galt ebenfalls noch zum Zeitpunkt der zweiten Messung 17 Tage post natum ($22.51 \pm 9.56\%$). Die drei weiteren Werte ($24.42 \pm 8.6\%$, $21.52 \pm 7.88\%$ und $19.02 \pm 7.89\%$) entsprachen ungefähr denjenigen der Kälber A die konvertierten zu den entsprechenden Zeitpunkten. Die 9 Kälber der Gruppe B, die konvertierten, zeigten am Anfang einen relativ tiefen Wert von $3.50 \pm 5.74\%$. Eine Woche später war dieser auf $6.38 \pm 4.86\%$ angestiegen. In der zweiten Woche post vaccinationem stieg er markant und erreichte sein Maximum von $40.98 \pm 7.49\%$, was zugleich dem höchsten Wert aller vier Gruppen entsprach, um dann in den folgenden zwei Wochen in gleichem Masse wie bei Gruppe B/nein und Gruppe A/ja, über $37.83 \pm 7.58\%$ auf $33.51 \pm 7.96\%$ abzusinken.

Signifikanzen ergaben sich bei den Vergleichen der Gruppen A und B ($P=0.0049$) sowie bei den Konzentrationen ($P<0.0001$) und der Interaktion Konzentration mit konvertiert ($P<0.0001$). Die restlichen statistischen Auswertungen ergaben keine signifikanten Resultate.

Wurde die Statistik mit dem Modell Gruppe und konvertiert oder nicht konvertiert betrachtet, so ergab sich ein signifikanter Unterschied ($P=0.043$) für die Interaktion Gruppe und konvertiert. Unterschiede in den Konzentrationen sowie in den Konzentrationen und den Gruppen/konvertiert blieben hoch signifikant ($P<0.0001$).

Signifikante Unterschiede bestanden in diesem Falle auch zwischen den Kälbern der Gruppe A, die nicht konvertierten (=Anein) und den Kälbern der Gruppe B, die konvertierten (=Bja; $P=0.017$) sowie den erstgenannten Kälbern und den Tieren der Gruppe B, die nicht konvertierten (=Bnein; $P=0.019$). Tendenzen waren zwischen den Gruppen Aja und Anein ($P=0.186$), zwischen Aja und Bja ($P=0.092$) sowie zwischen Aja und Bnein ($P=0.105$) zu erkennen.

Eine andere Modellierung der Resultate war bezüglich der Konzentrationsunterschiede (=D.Konz.1-4) zwischen den einzelnen Proben möglich (Abbildung 14). Wie bereits früher erwähnt, zeigten D.Konz.1 (Konzentrationsdifferenz zwischen Probe 1 und Probe 2), D.Konz.2 (Konzentrationsdifferenz zwischen Probe 1 und Probe 3), D.Konz.3 (Konzentrationsdifferenz zwischen Probe 1 und Probe 4) sowie D.Konz.4 (Konzentrationsdifferenz zwischen Probe 1 und Probe 5) signifikante Unterschiede. Sie gaben Auskunft über die Stärke der Impfreaktionen.

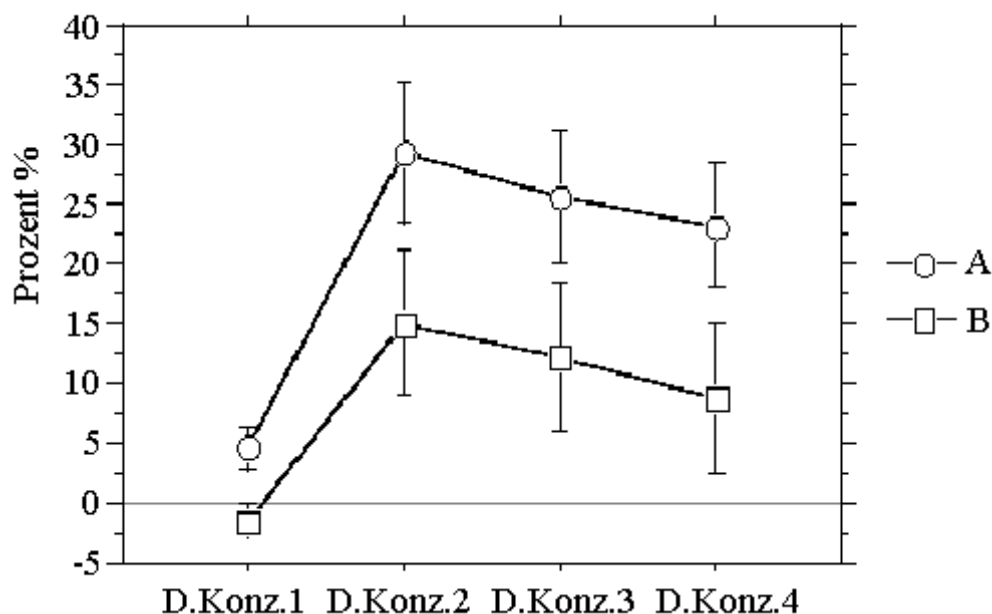


Abb. 14: Mittelwerte und Standard-Fehler der Differenzen der Antikörperkonzentrationen (D.Konz.1 bis D.Konz.4) der A-Kälber (—○—) und der B-Kälber (—□—).

Auch hier zeigte sich ein unterschiedlicher Verlauf der Kurve für die A- und die B-Tiere. Über die gesamte Versuchsdauer lagen die Konzentrationsdifferenzen der A-Kälber tendenziell höher als die der B-Kälber ($P=0.082$). Das heisst, die Impfreaktionen der A-Kälber waren tendenziell heftiger als die der B-Kälber. Die Muster der beiden Kurven wiesen im Verlauf grosse Ähnlichkeiten auf. Zwischen der ersten und der zweiten Beprobung fand bei den A-Kälbern nur ein geringer Konzentrationsanstieg von $4.57 \pm 1.75\%$ statt, während bei den B-Kälbern sogar ein kleiner Abfall von durchschnittlich $-1.47 \pm 1.46\%$ zu verzeichnen war. D.Konz.2 war bei beiden Gruppen durchschnittlich am grössten. Die Differenz betrug bei der Gruppe A $29.42 \pm 5.84\%$ und bei der Gruppe B $15.16 \pm 6.19\%$. Zwischen D.Konz.1 und D.Konz.2 bestand ein hoch signifikanter Unterschied ($P<0.0001$). Dies galt unabhängig davon, ob der Wert für die A-Tiere zusammen mit dem Wert für die B-Tiere betrachtet wurde, oder ob man diese zwei Gruppen separat verfolgte.

Später nahmen die Konzentrationsdifferenzen bei beiden Gruppen wieder ab. Zwischen D.Konz.2 und D.Konz.4 war bei Betrachtung beider Gruppen zusammen der Unterschied ebenfalls signifikant ($P=0.011$), bei Betrachtung der Gruppen getrennt voneinander jedoch nur tendenziell ($P=0.051$ für Gruppe A und $P=0.089$ für Gruppe B).

Bei der Betrachtung der absolut grössten Konzentrationsdifferenzen (=D.Konz.max) jedes Kalbes über die gesamte Versuchsdauer ergab sich für beide Gruppen ein etwas höherer Wert als die oben genannten. Dies aufgrund der Tatsache, dass die jeweils absolut grössten Konzentrationsdifferenzen in manchen Fällen D.Konz.3 oder D.Konz.4 entsprachen. Dieser Wert betrug für die Kälber der Gruppe A $29.97 \pm 5.70\%$ und für die Kälber der Gruppe B $18.21 \pm 5.59\%$. Diese beiden Werte unterschieden sich tendenziell ($P=0.15$).

6.5. Kategorische Auswertung

Bisher wurden die im Versuch ermittelten Daten in Form der gemessenen Absorptionswerte und der daraus errechneten relativen Antikörper-Konzentrationen in ihrem zeitlichen Verlauf diskutiert. Es soll an dieser Stelle nun eine kategorische Auswertung der Resultate erfolgen.

Unterschiedlich festgelegte Grenzwerte auf Grund von Sensitivitätsanalysen für die Aufnahme von Kolostrumantikörpern durch die Kälber und für die Serumkonversion der Kälber nach ihrer Impfung sowie die Kombination dieser Grenzwerte führten zu sechs unterschiedlichen Gruppierungen der Kälber. Als Grenzwerte für die Aufnahme von Kolostrumantikörpern durch die Kälber wurden Konzentrationsänderungen von $>4\%$ respektive $>10\%$ festgelegt und für die Serumkonversion der Kälber nach ihrer Impfung wurden Konzentrationsänderungen von $>5\%$, $>8\%$ oder $>10\%$ festgelegt. Diese Grenzwerte wurden in Kapitel 4.4. bereits besprochen. Abbildung 16 bis Abbildung 21 zeigen die sechs daraus resultierenden graphischen Darstellungen.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 4%; Konv. Kb: 5%

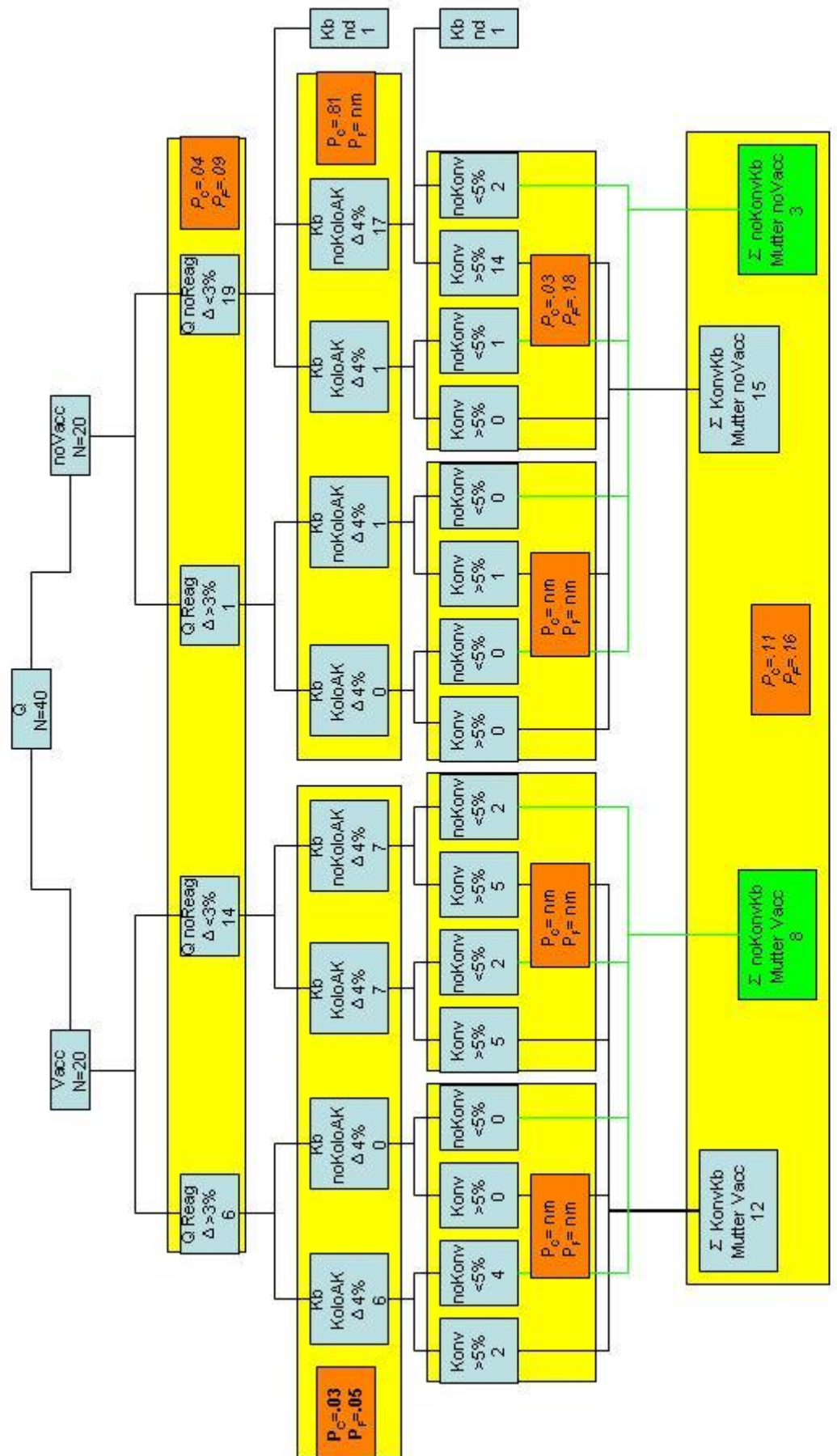


Abb. 16: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% (= $\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 4% (= $\Delta 4\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 5%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert (= $\sum \text{KonvKb}$) respektive nicht konvertiert (= $\sum \text{noKonvKb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test (= P_C) und Fisher-Exact-Test (= P_F). nm = nicht messbar.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 4%; Konv. Kb: 8%

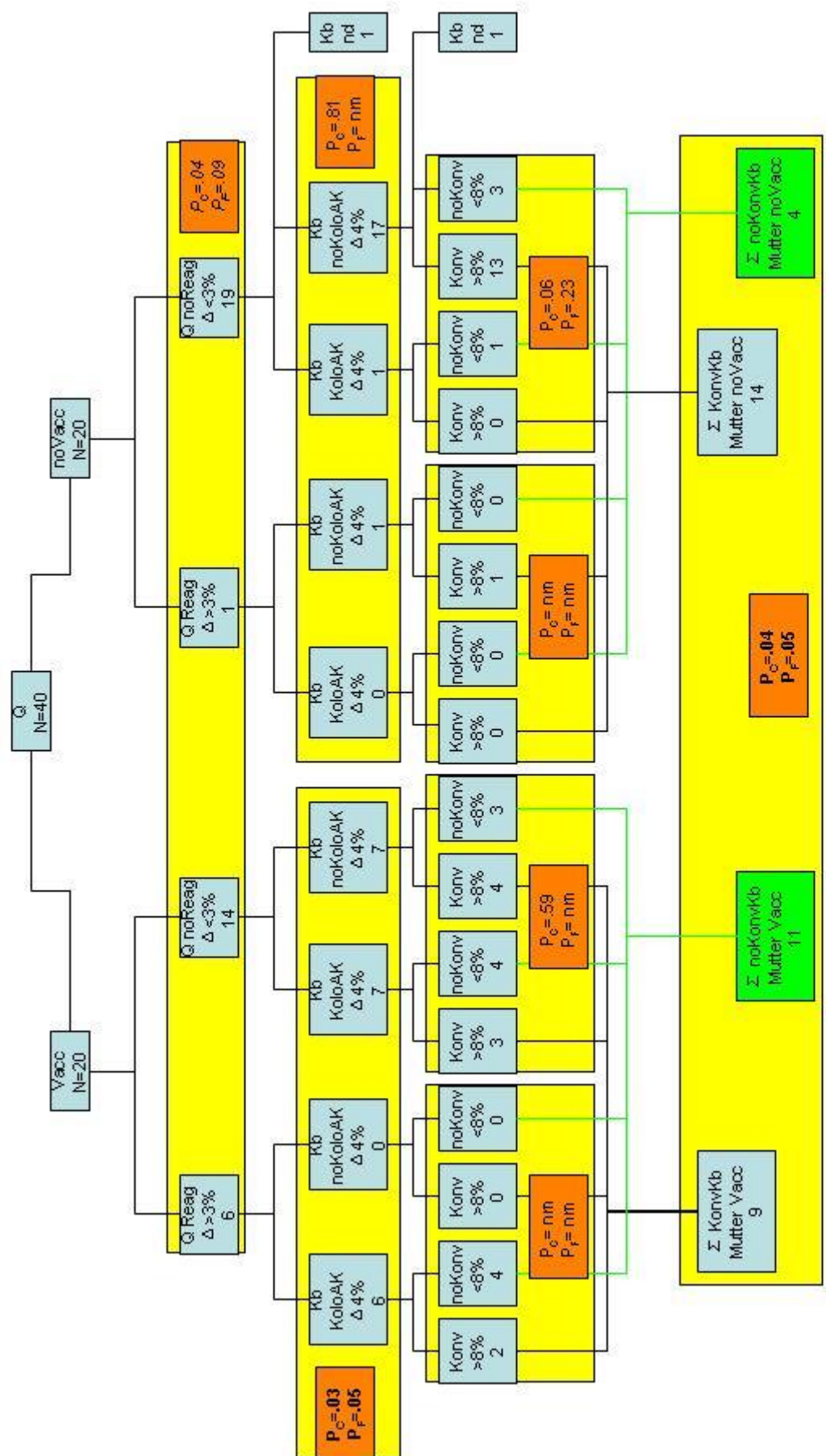


Abb. 17: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% (= $\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 4% (= $\Delta 4\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 8%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert (= $\sum \text{Konv Kb}$) respektive nicht konvertiert (= $\sum \text{noKonv Kb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test (= P_C) und Fisher-Exact-Test (= P_F). nm = nicht messbar.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 4%; Konv. Kb: 10%

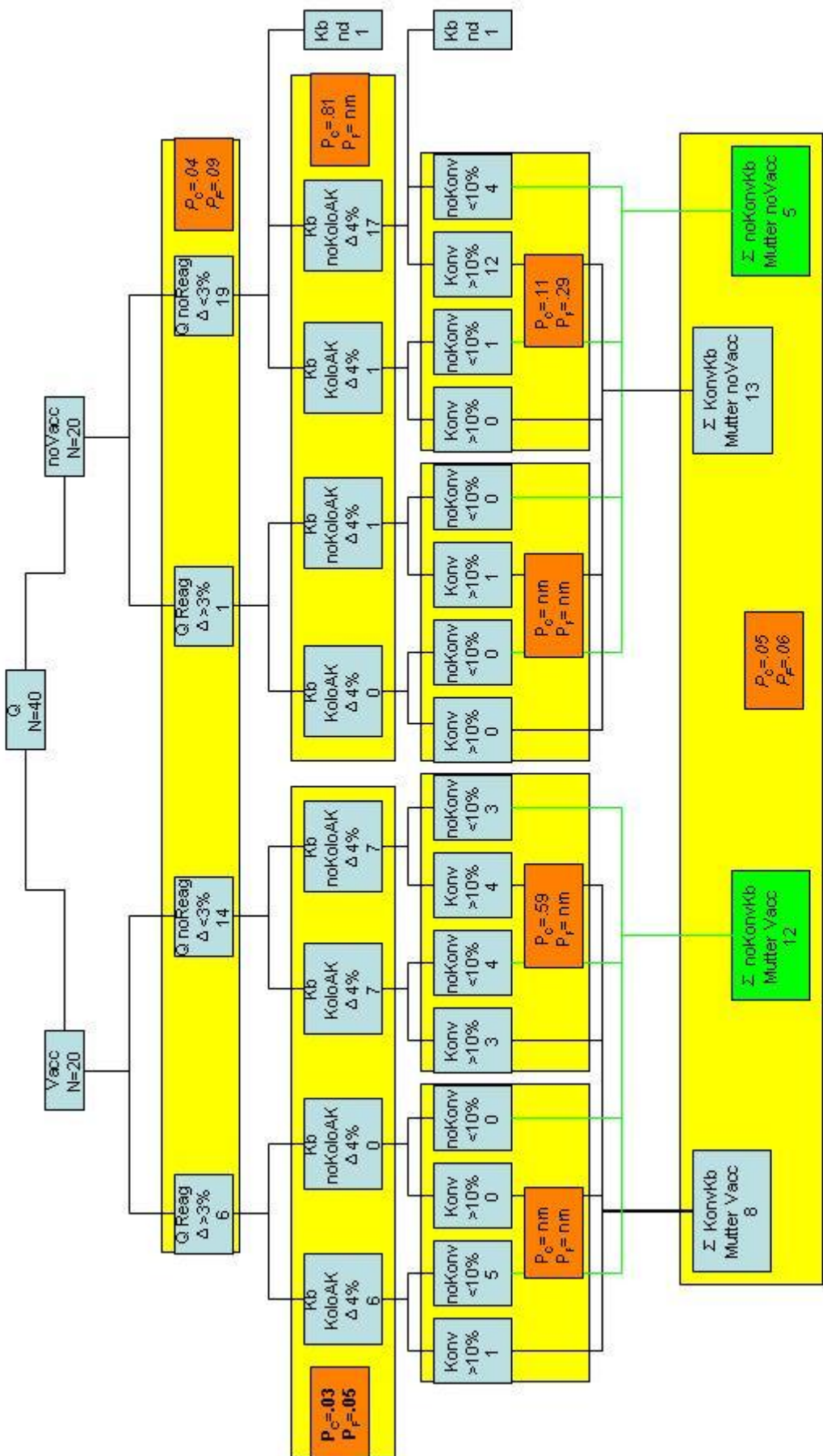


Abb. 18: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% ($\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 4% ($\Delta 4\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 10%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert ($= \sum \text{KonvKb}$) respektive nicht konvertiert ($= \sum \text{noKonvKb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test ($= P_C$) und Fisher-Exact-Test ($= P_F$). nm = nicht messbar.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 10%; Konv. Kb: 5%

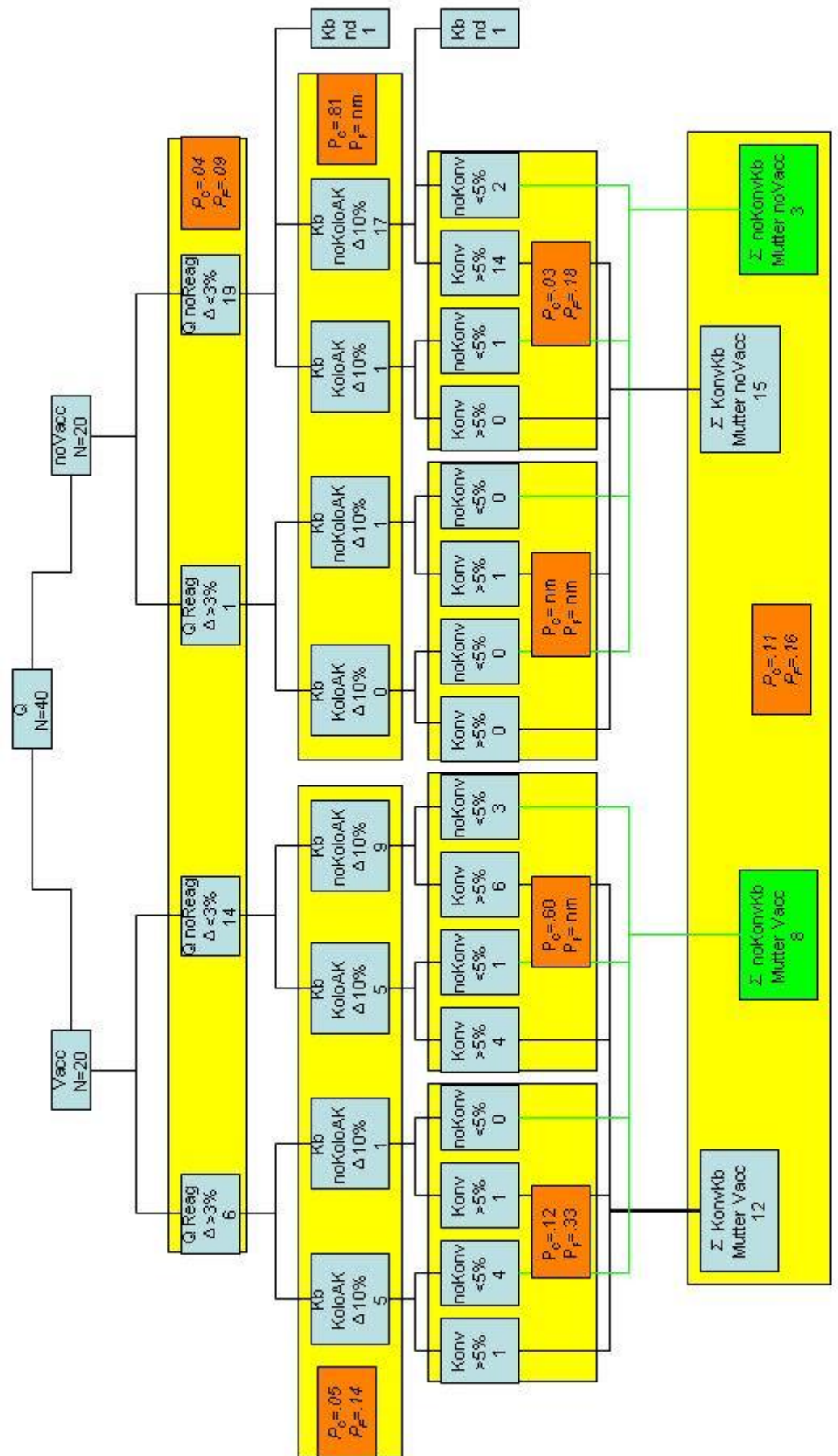


Abb. 19: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% ($\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 10% ($\Delta 10\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 5%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert ($= \sum \text{KonvKb}$) respektive nicht konvertiert ($= \sum \text{noKonvKb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test ($= P_C$) und Fisher-Exact-Test ($= P_F$). nm = nicht messbar.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 10%; Konv. Kb: 8%

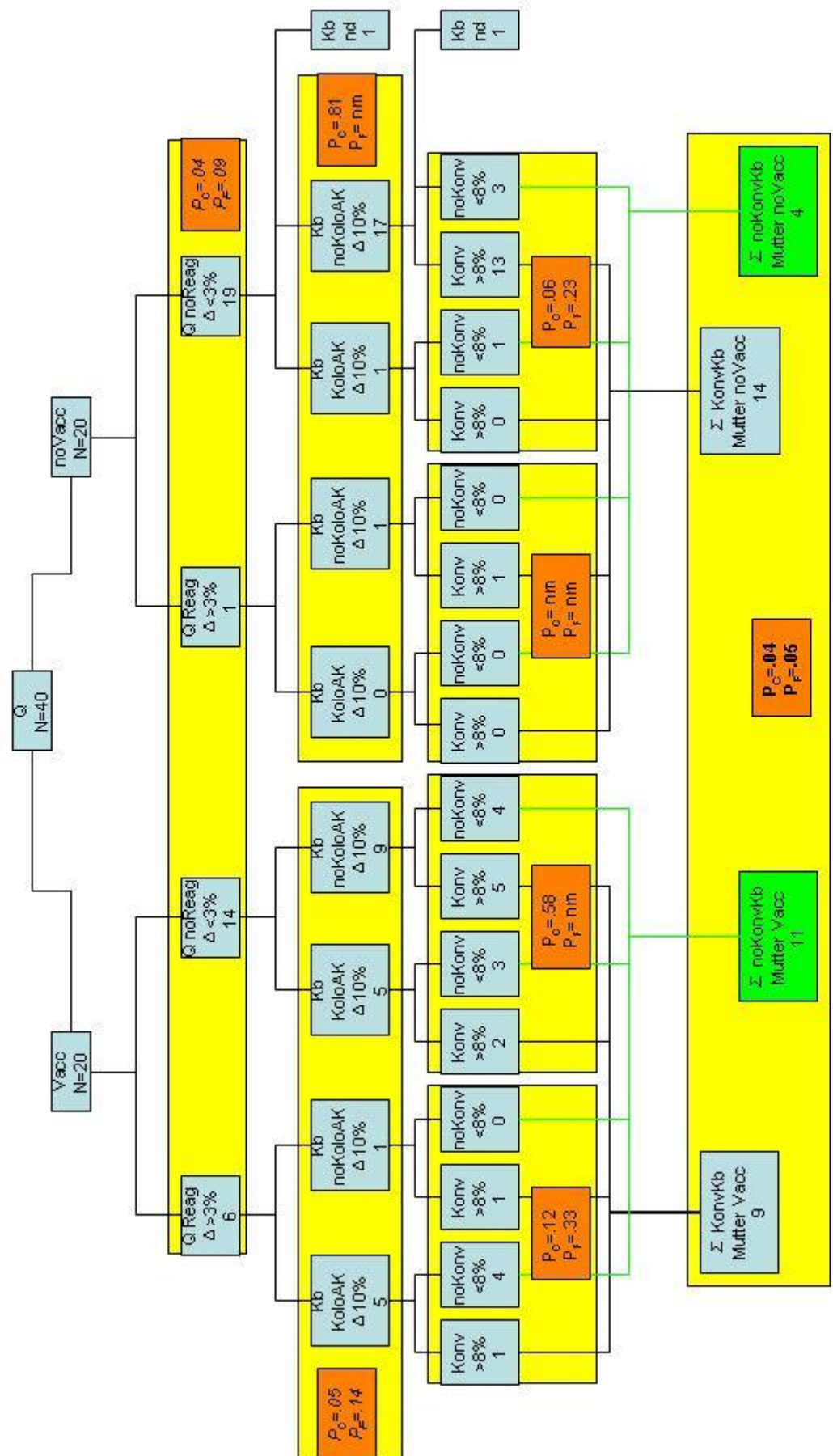


Abb. 20: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% ($\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 10% ($\Delta 10\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 8%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert ($= \sum \text{KonvKb}$) respektive nicht konvertiert ($= \sum \text{noKonvKb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test ($= P_C$) und Fisher-Exact-Test ($= P_F$). nm = nicht messbar.

Grenzwerte: Δ Kolostrum: 10%; Konv. Kb: 10%

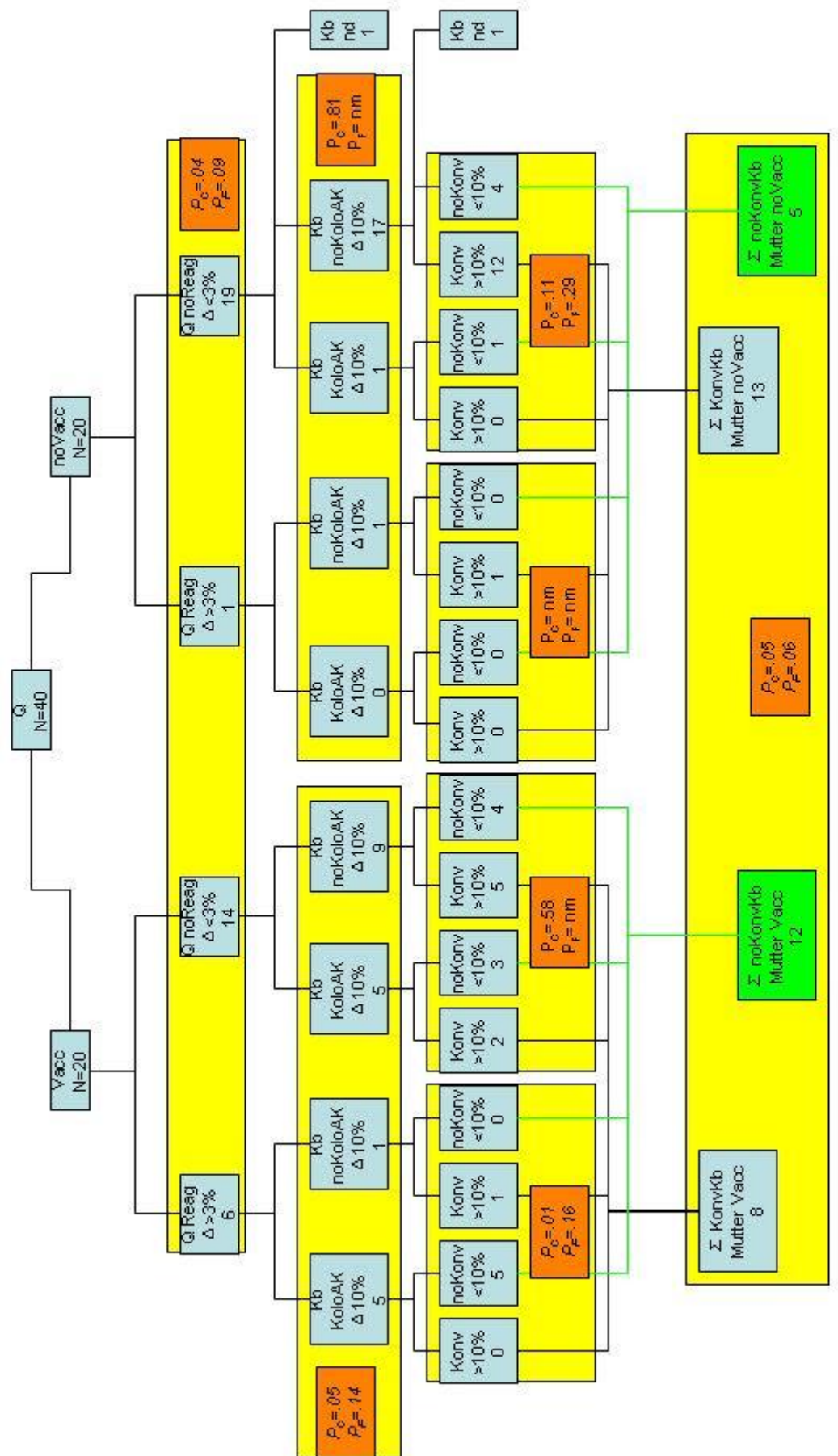


Abb. 21: Einteilung der Versuchstiere in Gruppen. Unterteilung der Kühe (= Q, Mutter) in geimpfte (= Vacc) und mit Placebo behandelte (= noVacc), sowie weitere Unterteilung in Reagenten (= Reag) und Nicht-Reagenten (= noReag); Grenzwert der Antikörper-Konzentrationsänderung für die Kühe ist 3% ($\Delta > 3\%$ oder $\Delta < 3\%$). Unterteilung der Kälber (= Kb) in Tiere, die mehr Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben (= KoloAK) als der vorgegebene Grenzwert von 10% ($\Delta 10\%$) und solche, die weniger aufgenommen haben (= noKoloAK). Weitere Unterteilung der Kälber in solche, die nach ihrer Impfung serokonvertieren (= Konv) oder eine geringere Serokonversion durchgemacht haben (= noKonv) als der vorgegebene Grenzwert (= 10%). Dargestellt wird in der untersten Zeile der Graphik die Summe der Kälber von geimpften Kühen (= Mutter Vacc), sowie die Summe der Kälber von nicht geimpften Kühen (= Mutter noVacc), die konvertiert ($= \sum \text{KonvKb}$) respektive nicht konvertiert ($= \sum \text{noKonvKb}$) haben. Kb nd = während des Versuchs ausgeschiedenes Kalb. Statistik: für die einzelnen Gruppen bestimmte Signifikanzen nach Chi²-Test ($= P_C$) und Fisher-Exact-Test ($= P_F$). nm = nicht messbar.

Im Weiteren sollte nur auf die Abbildung 17 genauer eingegangen werden, da diese nach der Sensitivitätsanalyse die Resultate mit der besten Trennschärfe lieferte.

Von den 20 geimpften Kühen waren sechs Reagenten und 14 Nichtreagenten. Von den 20 mit Placebo geimpften Tieren galt eine Kuh als Reagent und 19 Kühe waren Nichtreagenten. Gemäss Chi²-Test war dieses Resultat signifikant ($P_C=0.04$). Das aufgrund der kleinen Versuchstierzahl korrigierte Ergebnis gemäss Fisher-Exact-Test zeigte eine Tendenz ($P_F=0.09$), dass geimpfte Tiere eher reagierten als nicht geimpfte.

Eine Stufe weiter unten im Diagramm zeigte sich, dass alle sechs Kälber der reagierenden, geimpften Mütter Kolostrum-Antikörper aufnahmen. Von den nicht reagierenden, geimpften Kühen nahmen sieben Kälber Antikörper über das Kolostrum auf und sieben Kälber nicht. Die statistische Auswertung zeigte für diese Gruppe mit $P_C=0.03$ und $P_F=0.05$ einen signifikanten Unterschied. Auf der rechten Seite der mit Placebo behandelten Tiere nahm das eine Kalb der reagierenden Mutter keine Kolostrum-Antikörper auf. Von den 19 Kälbern der nicht reagierenden Kühe fiel eines aus und eines nahm Kolostrum-Antikörper auf. Bei den restlichen 17 Tieren steigerte sich die Antikörperkonzentration um weniger als 4% durch die Kolostrumaufnahme. Der P_C -Wert war in diesem Falle 0.81, der P_F -Wert nicht bestimmbar.

Eine Stufe weiter unten im Diagramm wurden nächste Unterteilungen vorgenommen: Kälber, die nach ihrer eigenen Impfung konvertierten und Kälber, die nicht konvertierten. In der Gruppe der geimpften Kühe, die selbst reagierten, fand man sechs Kälber, die Kolostrum-Antikörper aufnahmen. Von diesen konvertierten zwei Tiere. Vier Tiere konvertierten nicht. In der Gruppe der geimpften Kühe, die nicht reagierten, teilten sich die Kälber zu je 50% in solche, die Antikörper aufnahmen und andere, die nicht aufnahmen auf. Drei Kälber aus der Untergruppe der Kolostrum-Antikörper aufnehmenden konvertierten und vier nicht. Bei der Untergruppe der nicht über das Kolostrum Antikörper aufnehmenden Kälber war es umgekehrt. Die Statistik zeigte für diese Untergruppen weder Signifikanz noch Tendenz ($P_C = 0.59$). Auf der rechten Seite der Graphik (der nicht geimpften Kühe) sah die Verteilung auf derselben Stufe folgendermassen aus: Das eine Kalb der reagierenden Kuh, das über das Kolostrum keine Antikörper aufnahm, konvertierte. In der Gruppe der nicht reagierenden Kühe, konvertierte des einzige Kalb, das Kolostrum-Antikörper aufgenommen hatte, nicht. Von den 17 Kälbern, die keine Kolostrum-Antikörper aufgenommen hatten, fiel wiederum eines aus, 13 konvertierten und drei Kälber konvertierten nicht. Der Chi²-Test zeigte in dieser Gruppe eine starke Tendenz ($P_C=0.06$), der Fisher-Exact-Test jedoch nicht mehr ($P_F=0.23$) auf Grund der kleinen Fallzahlen.

Am Ende der Darstellung wurden die Summe der Kälber, die konvertierten und die Summe der Kälber, die nicht konvertierten zusammengefasst und verglichen in Abhängigkeit ob sie von einer geimpften oder nicht geimpften Mutter stammten. Total neun Kälber von geimpften Kühen konvertierten, 11 Kälber von geimpften Kühen konvertierten nicht. Im Gegensatz dazu konvertierten total 14 Kälber der nicht geimpften Kühe und vier Kälber konvertierten nicht. Die Statistik zeigte hier einen signifikanten ($P_C=0.04$, $P_F=0.05$) Unterschied.

7. Diskussion

Die Fragestellung dieser Arbeit war, beeinflussen passive, über das Kolostrum aufgenommene Antikörper die Immunantwort von neonatalen Kälbern und wenn ja, in welcher Form. Da in der Versuchsanordnung mit Leucogen® ein Modellimpfstoff zur Anwendung gelangte, musste zuerst die Frage geklärt werden, ob dieser, wie ursprünglich angenommen, wirklich auch eine entsprechende Wirkung zeigte, respektive ob er sich unter diesen Versuchsbedingungen gleich verhalten würde wie in der Arbeit von Hässig et al. (2007).

7.1. Zuverlässigkeit von Leucogen® beim Rind

Beim angewandten Versuch handelte es sich um einen Impfversuch. Von einem Impfstoff darf erwartet werden, dass er zuverlässig in einem sehr hohen Prozentsatz eine angemessene Impfreaktion im Impfling auslöst. Die direkte Wirkung der Impfung soll hier einerseits anhand der Impfreaktionen der Kühe diskutiert werden, andererseits etwas später im Zusammenhang mit den aktiven Immunreaktionen der Kälber. Es gilt aber zu beachten, dass der kommerzielle zur Anwendung gelangte Impfstoff durch den Hersteller für die Zielspezies Katze optimiert wurde und nicht für die Spezies Rind.

Tatsache war, dass nur sechs von 20 Kühen im Versuch als Reagenten galten. Waren es nur sechs von 20 Kühen, die wirklich reagierten, oder waren die Messmethoden zu ungenau und erfassten gewisse Reagenten nicht? Für die zweite Version spricht, dass die Hälfte der Kälber der nicht reagierenden Mütter eine bedeutende und klar messbare Menge Antikörper über das Kolostrum aufnahmen. Total besaßen also 13 von 20 Kälbern einen kolostralen Schutz. Dies im Vergleich zu 18 Tieren ohne Schutz oder genau einem Tier mit kolostralem Schutz auf der Seite der mit Placebo behandelten Kühe. Dieser Unterschied war signifikant ($P_C=0.03$, $P_F=0.05$). Die direkte Wirkung der Impfung war somit gut, aber nicht sehr gut.

Verschiedene Ansätze können zur Erklärung dieser Tatsache heran gezogen werden. Einerseits könnte die mässig gute immunologische Wirksamkeit damit zusammen hängen, dass es sich bei Leucogen® um ein sehr reines und spezifisches Impfantigen handelt. Von diesen sind solche Phänomene bekannt (Mayr 2002). Andere Impfstoffe, beispielsweise mit inaktivierten Ganzkeimen müssten demnach eine bessere Immunantwort induzieren. Auch andere Applikationsmethoden, vor allem vermehrte Wiederholungen der Grundimmunisierung der Kühe im trächtigen Stadium, wie in der Dissertationsarbeit von Stadler, als eine Kuh 15-mal innerhalb von 18 Monaten hyperimmunisiert wurde (Hässig et al. 2007), könnten eventuell zu noch besseren Resultaten führen. Dies müsste in Folgeversuchen erst bewiesen werden. Eine mehrmals wiederholte Impfung ist aber höchstens unter Versuchsbedingungen durchführbar. Sie steht ganz klar im Gegensatz zur Praxis, in der ein Impfstoff gefragt ist, der möglichst nur einmal angewendet werden muss und mit hoher Sicherheit einen möglichst hohen spezifischen Antikörpertiter im Impfling hervorruft.

Ein weiterer Versuch, die ungenaue Erfassung der Reagenten durch die gewählten Messmethoden zu erklären, ist der Folgende: Für den Versuch wurde ein Modellantigen (p45 des gp70 aus FeLV) gewählt, das bei der Kuh keine klinische Relevanz hat und somit möglichst nicht in Interferenz stehen sollte, mit bei Rindern üblichen Erregern. Dennoch zeigten die mit Placebo gespritzten Tiere teils deutlich positive Extinktionswerte im ELISA.

Diese bewegten sich im Bereich von 38% bis 41% des Wertes für geimpfte Kühe. Kreuzreaktionen sind demzufolge nicht ganz auszuschliessen.

Die indirekte Wirksamkeit des Impfstoffs wurde ebenfalls bewiesen. Die Kälber der geimpften Muttertiere (Kälber der Gruppe B) zeigten über die gesamte Versuchsdauer und dabei auch zu jedem einzelnen Zeitpunkt höhere Antikörperkonzentrationen als die Kälber der Placebo-Tiere ($P < 0.05$ für die gesamte Versuchsdauer und $P < 0.0001$ für die einzeln gemessenen Konzentrationen). Insgesamt stellte dies einen weiteren Beweis dar, dass die Mutterimpfung und die passive Antikörper-Übertragung erfolgreich waren.

7.2. Beeinflussung der Immunantwort des Neonaten

Es wird in dieser Studie bewiesen, dass die Impfung des Muttertieres im trächtigen Stadium und die spätere passive Versorgung des Kalbes mit Antikörpern des Kolostrums die Impfreaktion des neugeborenen Kalbes beeinflussen. Im Versuch konvertieren von 20 geimpften Kühen elf Kälber später nicht. Bei den 20 nicht geimpften Kühen konvertieren später nach eigener Impfung nur vier Kälber nicht. Dieser Unterschied ist auch statistisch belegt ($P_C = 0.04$, $P_F = 0.05$). Betrachten wir in einer Gruppe jeweils nur die Kälber, die auch passive Antikörper aufgenommen haben (13 Tiere von Impfkühen, 1 Tier von einer Placebo-Kuh), so sehen wir bei ihnen, dass sie im Verhältnis von 5:8 (Impfkühe) resp. 0:1 (Placebo-Kühe) konvertieren, während jene Kälber, die keine Kolostrum-Antikörper aufgenommen haben im Verhältnis 4:3 (Impfkühe) resp. 14:3 (Placebo-Kühe) konvertieren. Die in vorangehenden Arbeiten vielfach geäußerte Beeinflussung (Bögel und Liebelt 1963, Husband et al. 1972, Nicholls et al. 1984, Staak 1992) wird bestätigt. Alle Kälber, die nach ihrer eigenen Impfung serokonvertieren, weisen anfänglich eine tiefe Antikörper-Konzentration auf.

Dass Kolostrum-Antikörper die Impfreaktion beeinflussen, wurde bestätigt. Kälber von nicht geimpften Müttern zeigten im Schnitt eine stärkere Impfreaktion als Kälber von geimpften Müttern (siehe Abbildung 14), was sich hauptsächlich in den Antikörper-Konzentrationsdifferenzen der ersten 14 Tage nach der Kälberimpfung widerspiegelte. Die absoluten Werte für die maximal grössten Konzentrationsänderungen während des gesamten Versuches unterschieden sich tendenziell ($P = 0.15$) für die Kälber der Gruppe A und jene der Gruppe B.

Ein weiterer Beweis, dass je nach Menge der aufgenommenen maternalen Antikörper, die eigene Immunantwort der Kälber unterschiedlich gehemmt wird, lässt sich bei der Betrachtung der individuellen Unterschiede innerhalb der Gruppe der Kälber von geimpften Müttern feststellen. Kälber der Gruppe B mit anfänglich tiefen passiven Antikörperlevels (5B, 6B, 8B, 10B, 11B, 12B, 16B, 17B, 18B, 20B; durchschnittliche Startkonzentration an Antikörpern am Tag 10 post natum = -5.39) serokonvertierten stark (durchschnittliche D Konz max = 28.85). Kälber mit anfänglich mittleren passiven Antikörperkonzentrationen (2B, 4B, 9B, 14B, 19B; durchschnittliche Startkonzentration = 20.62) konvertierten mässig (durchschnittliche D Konz max = 15.14) und solche mit anfänglich hohen Antikörperkonzentrationen (1B, 3B, 7B, 13B, 15B; durchschnittlich Startkonzentration = 57.02) konvertierten gar nicht.

7.3. Der frühe Impfzeitpunkt der Kälber

Der Versuch zeigte, und das in Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien (Pery und Metzger 1990, Jungi 2000, Mayr 2002), dass die Impfung am 10. Lebenstag der Kälber keinesfalls zu früh erfolgte und in 2/3 der Fälle, in denen keine maternalen Antikörper vorhanden waren, dies auch zu einer angemessenen Immunreaktion des Kalbes führte. Ausnahmen bildeten nur drei Tiere aus der Gruppe A, die nicht konvertierten, obwohl sie keine maternalen Antikörper aufgenommen hatten, sowie drei Tiere aus der Gruppe B, die unter denselben Voraussetzungen ebenfalls nicht aktiv auf die Impfung reagierten. 1/3 der Kälber reagierte also nicht auf die Impfung. Vergleicht man dies mit den 70% aller Kühe, die nicht reagierten, oder noch genauer mit den 35% der Kühe, die keine Antikörper übertrugen, so sieht man, dass die Zuverlässigkeit der Impfung bei den Kälbern exakt im Bereich derjenigen der Kühe liegt. Eine vermutete, ähnlich hohe Zuverlässigkeit der Impfung zu einem noch früheren Zeitpunkt, eventuell gar zum Zeitpunkt der Geburt, müsste mit weiteren Versuchen noch bewiesen werden.

7.4. Empfehlungen

Ein möglichst hoher Schutz des Kalbes in den ersten Wochen des Lebens ist vor allem bei Mastkälbern gefragt, weil diese in der Schweiz schon zum Teil in einem Alter von einer Woche in Kälbermastbetriebe verstellt werden. Forderungen in der Schweiz durch Anbieter von Label-Produkten (z.B. Coop Natura Plan), Mastkälber erst zu einem späteren Zeitpunkt aus dem Herkunftsbetrieb in den Mastbetrieb zu verstellen, zielen darauf ab, dass die Kälber erst mit einer besseren Immunitätslage verstellt werden. Auf Grund der Studie von Hässig et al. (2007) sollten Kälber erst ab einem Alter von 6 Wochen verstellt werden. Coop Natura Plan hat einen Kompromiss mit vier Wochen in seine Auflagen aufgenommen. Ein möglichst hoher Schutz des Kalbes in den ersten Wochen des Lebens kann mit Mutterschutzvakzinen erreicht werden. Jegliche, noch so frühe aktive Immunisierung gegen Krankheitserreger, die in den ersten sieben bis 10 Tagen post natum angreifen, kommt zu spät für einen aktiven Schutz in den ersten Lebenstagen des Kalbes.

Kombiniert man die zwei Methoden der Mutterschutzvakzine und der aktiven Immunisierung der Kälber direkt bei der Geburt, so erreicht man in 80% der Fälle, einen Schutz bereits um Tag 10 bis 14 post natum. Viele dieser Tiere sind aber bereits von Geburt weg durch die maternalen Antikörper geschützt

Bei Mutterschutzimpfstoffen und einem Tränkemanagement, die zusammen in einem sehr hohen Prozentsatz der Fälle zu passiven Antikörper-Aufnahmen führen, wäre diese zweite Impfung gar nicht mehr nötig. Man erreichte auf alle Fälle ein Antikörper-Konzentrationsniveau, das jenem von geimpften Kälbern entspricht (Abbildung 13, Vergleich der Kurven der B-Tiere, die nicht konvertieren und der A-Tiere, die konvertieren). Bis zum Versuchsende am Tag 38 post natum verliefen diese beiden Kurven praktisch identisch. Ob die Kurve der passiven Antikörper im weiteren zeitlichen Verlauf schneller absinken würde als jene der aktiv produzierten ist unklar und bedürfte eines weiteren, länger dauernden Versuches.

Es ist anzunehmen, dass auch die Impfung des Jungtieres in einem sehr frühen Stadium einen Stressfaktor darstellt (May et al. 1979), der sich, wie die mangelnde Kolostrumaufnahme vorübergehend negativ auf die Gesundheit des Tieres auswirken könnte. Um diesbezüglich aber genauere Daten angeben zu können, sind weitere Untersuchungen nötig. Sicher wären bei solchen „Frühimpfungen“ Lebendimpfstoffe zu vermeiden.

Die einzigen Vorteile einer aktiven, frühen Immunisierung sind, wenn sie auch keinen rechtzeitigen Schutz mehr vor früh auftretende Krankheiten bieten, die Reduktion der Virusausscheidung der betroffenen Tiere und der damit reduzierte Infektionsdruck für andere Tiere (Bögel und Liebelt 1963, Bryson 1985, Kimman et al. 1989, Mayr 1991, Kohara et al. 1997, Larson et al. 1998, Bendali et al. 1999) und der Booster-Effekt der immunologischen Zweitreaktion bei erneutem, späterem Antigenkontakt (Jungi 2000, Mayr 2002).

Für Aufzuchttiere, die eine längere Zeit in ihrem Geburtsstall verbleiben, kann also vor allem die Mutterschutzvakzine empfohlen werden. Eine weitere aktive Immunisierung ist nicht zwingend nötig.

Für Kälber, die für die Mast vorgesehen sind, ist eine Mutterschutzvakzine ebenfalls äusserst sinnvoll. Sie ist in der Praxis auch sehr zu empfehlen, da der Entscheid, ob die Tiere zur Mast oder Zucht bestimmt sind, meist erst nach der Geburt der Tiere gefällt wird. Beim Handel mit Mastkälbern müsste dem Züchter ein zusätzlicher Gewinn in Aussicht gestellt werden, wenn er Kälber von mutterschutzvakzinierten Kühen anbietet. Mastkälber sollten aber zudem möglichst um die 4. Lebenswoche, wenn maternale Antikörper bereits zu einem gewissen Teil wieder verschwunden sind, nochmals aktiv immunisiert werden. Würden sie zwei Wochen darauf gehandelt, hätte man die grösste Sicherheit für einen idealen Start in die Mast.

Grundsätzlich sollte jedoch vor jedem Einsatz eines Impfstoffes die spezifische Situation beurteilt und unter Einbezug der zu bekämpfenden Erreger, des Alters der Tiere und des zu erwartenden, aktuellen Immunstatus, der ideale Impfzeitpunkt sowie die geeignetste Impf-Form festgelegt werden. Die Zukunft gehört hier unter anderem sicher den lokal angewandten Impfstoffen (beispielsweise intra nasal), die von den eventuell vorhandenen maternalen Antikörpern weniger beeinflusst werden.

7.5. Aussicht

In der heutigen Zeit, in der in Folge der neuen Tierarzneimittelverordnung viele altbewährte Medikamente vom Markt zurück gezogen werden und die verbleibenden für den Einsatz im Nutztiersektor zum Teil viel zu teuer sind, ist eine weitere Verschiebung hin zur prophylaktischen, preislich sehr interessanten Impfung nur logisch, sinnvoll und demzufolge zukunftssträchtig. Forschung in diesem Bereich, wie hier betrieben, muss die vorliegenden Resultate noch differenzierter betrachten und Kosten-Nutzen-Analysen durchführen.

In unserem Versuch haben wir das Augenmerk hauptsächlich auf die spezifischen Antikörper gelenkt, auf nur eine Komponente des Kolostrums. Maternale Leukozyten beispielsweise beschleunigen im Kalb jedoch die Entwicklung von antigenpräsentierenden Zellen (Reber et al. 2005). Zu befürworten wären daher auch noch aufwändigere Versuchsanordnungen, die nebst den Antikörpern auch den weiteren Faktoren der Immunantwort Beachtung schenken. Gleichzeitige Messungen von Zytokinen und maternalen Zellen (Leukozyten) im Kolostrum und deren Auswirkungen auf das Kalb, könnten durchaus neue Erkenntnisse liefern.

8. Literaturverzeichnis

- ANONYM (1993): Beef cow/calf health and productivity audit, part I: beef cow/calf herd management practices in the United States. National Animal Health Monitoring System (NAHMS), Ft Collins, C. O.: Center for Animal Health Monitoring-Veterinary Services.
- BANKS, K. L. (1982): Host defence in the newborn animal. J. Am. Vet. Med. Assoc. 181, 1053-1056.
- BARRINGTON, G.M. (2001): Bovine neonatal immunology. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 17, 463-476.
- BELLOWS, R. A., D. J. PATTERSON, P. J. BURFENING, et al. (1987): Occurrence of neonatal and postnatal mortality in range beef cattle, Part II. Factors contributing to calf death. Theriogenology 28, 573-586.
- BENDALI, F., M. SANAA, H. BICHET, F. SCHELCHER (1999): Risk factors associated with diarrhoea in newborn calves. Vet. Res. 30, 509-522.
- BESSER, T. E., A. E. GARMEDIA, T. C. MCGUIRE, C. C. GAY (1985): Effect of colostral immunoglobulin G and immunoglobulin M concentrations on immunoglobulin-absorption in calves. J. Dairy Sci. 68, 2033-2037.
- BESSER, T. E., O. SZENI, C. C. GAY (1990): Decreased colostral immunoglobulin absorption in calves with postnatal respiratory acidosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 196, 1239-1243.
- BOEGEL, K., J. LIEBELT (1963): Beziehung zwischen maternalen Antikörpern und Impferfolg nach der Vaccinierung des Kalbes mit Parainfluenza-3-Lebendimpfstoff. Zentralbl. Bakteriologie 191, 133-138.
- BRYSON, D. G. (1985): Calf pneumonia. Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract. 1, 237-257.
- BUCHHOLZ, I., G. MEHLHORN (1985): Der Einfluss des sichtbaren Lichts auf die humoralen Immunreaktionen des Kalbes. Arch. Exp. Veterinärmed. 39, 220-233.
- CHASE, C. C. L., D. J. HURLEY, A. J. REBER (2008): Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet. Clin. Food Anim. 24, 87-104.
- CONNER, G. H., M. RICHARDSON, G. R. CARTER, J. P. WAMUKOYA (1977): Immune responses of the bovine fetus. J. Dairy Sci. 60, 289-293.
- CORNAGLIA, E. M., F. M. FERNANDEZ, M. GOTTSCHALK, M. E. BARRANDEGUY, A. LUCHELLI, M. I. PASINI, L. J. SAIF, J. R. PARRAUD, A. ROMAT, A. A. SCHUDEL (1992): Reduction in morbidity due to diarrhea in nursing beef calves by use of an inactivated oil-adjuvanted rotavirus-Escherichia coli vaccine in the dam. Vet. Microbiol. 30, 191-202.

EIGENMANN, U. J., W. ZAREMBA, K. LUETGEBRUNE, E. GRUNERT (1983): Untersuchungen über die Kolostrumaufnahme und die Immunglobulinabsorption bei Kälbern mit und ohne Geburtsazidose. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 109-113.

ELLIS, J., S. GOW, K. WEST et al. (2007): Response of calves to challenge exposure with virulent bovine respiratory syncytial virus following intranasal administration of vaccines formulated for parenteral administration. J. Am. Vet. Med. Assoc. 230, 233-243.

ERHARD, M. H., P. AMON, S. NUESKE, M. STANGASSINGER (1999): Studies on the systemic availability of maternal and endogeneously produced immunoglobulin G1 and G2 in newborn calves by using newly developed ELISA systems. J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr. 81, 239-248.

FERENČIK, M. (2006): Einleitung, Immunsystem – Eigenschaften und Struktur. In: Kompendium der Immunologie. Grundlagen und Klinik, 1. Aufl., Hrsg. M. Ferenčík, J. Rovensky, V. Mat'ha, M. Herold. Springer-Verlag, Wien und New York, 1-15.

HASSIG, M., T. STADLER, H. LUTZ (2007): Transition from maternal to endogenous antibodies in newborn calves. Vet. Rec. 160, 234-235.

HODGINS, D. C., P. E. SHEWEN (2000): Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1. Can. J. Vet. Res. 64, 3-8.

HOFMANN, W. (1987): Wie häufig müssen Muttertiervakzinationen zur Vorbeuge der Rota- und Coronavirus-Infektionen der Kälber (Neugeborenenendiarrhoe) wiederholt werden? Dtsch. Tierärztl. Wschr. 94, 298-301.

HUSBAND, A. J., M. R. BRANDON, A. K. LASCELLES (1972): Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 50, 491-498.

IVANOFF, M. R., H. W. RENSHAW (1975): Weak calf syndrome: Serum immunoglobulin concentrations in precolostral calves. Am. J. Vet. Res. 36, 1129-1131.

JUNGI, T. W. (2000): Einführung in die Grundlagen der Immunologie, Grundlagen der Immunstörungen. In: Klinische Veterinärimmunologie, 1. Aufl., Hrsg. T. W. Jungi. Enke im Hippokrates Verlag, Stuttgart, 1-62.

KAYSER, F. H. (1997): Allgemeine Aspekte der Medizinischen Mikrobiologie. In: Medizinische Mikrobiologie, 9. Aufl., Hrsg. F. H. Kayser, K. A. Bienz, J. Eckert, R. M. Zinkernagel. Thieme, Stuttgart, 2-7.

KIM, J. W., F. W. SCHMIDT (1983): Zur Frage der Absorption von kolostralen Immunoglobulinen durch das Kalb. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 90, 283-286.

KIMMAN, T. G., F. WESTENBRINK, P. J. STRAVER (1989): Priming for local and systemic antibody memory responses to bovine respiratory syncytial virus: effect of amount of virus, virus replication, route of administration and maternal antibodies. Vet. Immunol. Immunopathol. 22, 145-160.

KOETSCHKE, W. (1991): Wörterbuch der Veterinärmedizin, 3. Aufl., Hrsg. E. Wiesner und R. Ribbeck. Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart.

KOHARA, J., T. HIRAI, K. MORI, H. ISHIZAKI, H. TSUNEMITSU (1997): Enhancement of passive immunity with maternal vaccine against newborn calf diarrhea. J. Vet. Med. Sci. 59, 1023-1025.

KRUSE, P. E. (1983): The importance of colostral immunoglobulins and their absorption from the intestine of the newborn animal. Ann. Rech. Vét. 14, 349-353.

LAMBRECHT, G., H. FRERKING, E. HENKEL (1982): Bestimmung von IgG, IgA und IgM im Erstkolostrum des Rindes mit Hilfe der Nephelometrie und der radialen Immunodiffusion unter besonderer Berücksichtigung von Jahreszeit, Laktationsnummer und Vererbung. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 89, 107-110.

LARSEN, L. E., C. TEGTMEIER, E. PEDERSEN (2001): Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) pneumonia in beef calf herds despite vaccination. Acta Vet. Scand. 42, 113-121.

LARSON, R. L., V. L. PIERCE, R. F. RANDLE (1998): Economic evaluation of neonatal health protection programs for cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 810-816.

LOGAN, E. F., A. STENHOUSE, D. J. ORMROD, W. J. PENHALE (1974): The Role of Colostral Immunoglobulins in Intestinal Immunity to Enteric Colibacillosis in the Calf. Res. vet. Sci. 17, 290-301.

MARTIN, S. W., C. W. SCHWABE, C. E. FRANTI (1975): Dairy calf mortality rate: Characteristics of calf mortality rates in Tulare County, California. Am. J. Vet. Res. 36, 1099-1104.

MATTE, J. J., C. L. GIRARD, J. R. SOANE, G. J. BRISSON (1982): Absorption of colostral immunoglobulin G in the newborn dairy calf. J. Dairy Sci. 65, 1765-1770.

MAY, I., I. MANOIU, C. DONTA, M. TETU, C. VIOR, S. MOLDOVAN (1979): Stress und Immunität beim Rind. Arch. Exp. Veterinärmed. 33, 87-98.

MAYR, A. (2002): Grundlagen der allgemeinen medizinischen Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Aufl., Hrsg. A. Mayr. Enke Verlag, Stuttgart, 1-64.

MAYR, B. (1991): Infektionsprophylaxe in der Kälbermast. Tierärztl. Prax. 19, 124-126.

MCGUIRE, T. C., N. E. PFEIFFER, J. M. WEIKEL ET AL. (1976): Failure of colostral immunoglobulin transfer in calves dying from infectious disease. J. Am. Vet. Med. Assoc. 169, 713-718.

MOREIN, B., I. ABUSURA, G. BLOMQUIST (2002): Immunity in neonates. Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 207-213.

MORRILL, J. C., C. A. MEBUS, C. J. PETERS (1997): Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovids. Am. J. Vet. Res. 58, 1110-1114.

MULLANEY, T. P., L. E. NEWMAN, C. K. WHITEHAIR (1988): Humoral immune response of the bovine fetus to in utero vaccination with attenuated bovine coronavirus. *Am. J. Vet. Res.* 49, 156-159.

NICHOLLS, M. J., L. BLACK, M. M. RWEYEMAMU, J. GENOVESE, R. FERRARI, C. A. HAMMANT, E. DE SILVA, O. UMEHARA (1984): The effect of maternally derived antibodies on the response of calves to vaccination against foot and mouth disease. *J. Hyg. (Lond)* 92, 105-116.

PERY, P. und J. J. METZGER (1990): Allgemeine Immunologie. In: *Das Kalb. Anatomie, Physiologie, Aufzucht, Ernährung, Produktion, Pathologie*, 1. Aufl., Hrsg. P. Mornet, J. Espinasse, Schober Verlags GmbH, Hengersberg, 198-212.

PRITCHETT, L. C., C. C. GAY, T. E. BESSER, D. D. HANCOCK (1991): Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 74, 2336-2341.

REBER, A. J., A. R. HIPPEN, D. J. HURLEY (2005): Effects of the ingestion of whole colostrum or cell-free colostrum on the capacity of leukocytes in newborn calves to stimulate or respond in one-way mixed leukocyte cultures. *Am. J. Vet. Res.* 66, 1854-1860.

RECCA, A., E. CALVO, C. F. CROUCH, H. NAVETAT, C. RIZET, R. GUIJARRO, J. PEREZ-GARCIA, M. J. FRANCIS (2003): Comparative lactogenic antibody responses of cattle from European field trials with a new enteric disease vaccine. *Vet. Rec.* 152, 751-752.

SCHAETZ, F. (1991): Wörterbuch der Veterinärmedizin, 3. Aufl., Hrsg. E. Wiesner und R. Ribbeck. Gustav Fischer Verlag, Jena und Stuttgart, 1035.

SELBITZ, H. J., M. MOOS (1997): Schutzimpfungen beim Rind. In: *Tierärztliche Impfpraxis*, 2. Aufl., Enke, 36-67.

SNODGRASS, D. R. and P. W. WELLS (1978): Passive Immunity in Rotaviral Infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 173, 565-569.

SNODGRASS, D. R., J. STEWART, J. TAYLOR, F. L. KRAUTIL, M. L. SMITH (1982): Diarrhoea in dairy calves reduced by feeding colostrum from cows vaccinated with rotavirus. *Res. Vet. Sci.* 32, 70-73.

STAAK, C. (1992): Rinder-Kolostrum und Schutz des Jungtieres. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 105, 219-224.

STADLER, T. (2002): Übergang von maternaler zu endogener IgG-Dominanz beim neugeborenen Kalb. Dissertation Universität Zürich.

STEINBACH, G. and H. MEYER (1977): Grundlagen der Immunreaktion. *Mh. Vet.- Med.* 32, 103-107.

WHITE, D. G. and A. H. ANDREWS (1986): Adequate concentration of circulating colostrum proteins for market calves. *Vet. Rec.* 119, 112-114.

WITTUM, T. E., L. J. PERINO (1995): Passive immune status at postpartum hour 24 and long-term health and performance of calves. Am. J. Vet. Res. 56, 1149-1154.

ZAREMBA, W., E. GRUNERT, W. HEUWIESER, H. SCHIFFNER-MEHRENS (1985): Untersuchungen über die Immunglobulinabsorption bei Kälbern nach Verabreichung von Kolostrum per Schlundsonde im Vergleich zur freiwilligen Aufnahme. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 92, 18-20.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken, insbesondere

- Herrn Prof. Dr. M. Hässig für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats, die kompetente Hilfe bei der statistischen Auswertung und die stets geduldige und freundliche Beratung und Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. U. Braun unter dessen Institutsleitung ich diese Arbeit durchführen durfte.
- Herrn Prof. Dr. M. Suter für die Übernahme des Korreferats.
- Herrn Prof. Dr. H. Lutz für die zur Verfügung gestellten Impfstoffe und Laborhilfen und die Beratung bei der Erarbeitung der Laborprotokolle.
- All den Laborantinnen des Veterinärmedizinischen Labors für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Arbeiten mit den Proben, ganz speziell Marlies und Bea.
- Meinen Arbeitskollegen des Ambulanzteams, Herrn Dr. N. Siegwart, Frau Dr. K. Neges, Frau Dr. B. Bryce, Frau Dr. C. Syring, Herrn Dr. T. Friolet und Herrn Dr. P. Zulliger, die zum guten Arbeitsumfeld Wesentliches beigetragen haben und bei der Gewinnung der Proben mithalfen.
- Den Kunden der Ambulanz, welche mir ihre Kühe und Kälber für den Versuch geduldigst anvertraut haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Ruth, die mich immer wieder motiviert hat, sowie Max und Heidi Jost aus Fanas. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zu Stande gekommen. Ihre Unterstützung war grossartig.

Abschliessen möchte ich mit dem grössten Dank an meine Eltern Uli und Dagmar. Sie waren da, hatten jahrelang Zeit und offene Ohren für meine Anliegen, haben mich gefördert und unterstützt, mir die Welt gezeigt und in mir das Interesse für sie und ihre Geheimnisse geweckt und mich das Wundern doch nie verlernen lassen.

Lebenslauf

Name	Wetli, Urs Andreas
Geburtsdatum	4. Juli 1974
Geburtsort	Affoltern am Albis, ZH
Nationalität	Schweizer
Heimatorte	Küsnacht, Männedorf und Hombrechtikon

1981 – 1987	Primarschule in Mettmenstetten (ZH)
1987 – 1989	Sekundarschule in Mettmenstetten (ZH)
1989 – 1994	Kantonale Mittelschule in Urdorf (ZH) mit Matura Typus C
1994 – 1996	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich mit zweitem Propädeutikum
1996 – 1997	Studium der Veterinärmedizin an der Universität Córdoba in Andalusien, Spanien
1997 – 1999	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich
10. Nov. 1999	Staatsexamen Veterinärmedizin, Vetsuisse-Fakultät der Universität Zürich, Schweiz
1999 – 2001	Assistent in der Tierarztpraxis Dr. W. Zindel, Maienfeld (GR)
2001 – 2004	Assistent in der Tierklinik Dr. D. Burki, Schaffhausen
2004 – 2006	Assistent und Doktorand am Departement für Nutztiere der Universität Zürich, Abteilung Ambulanz
2006 – 2007	Assistent in der Tierarztpraxis M. + M. Bischoff-Pool, Sent (GR)
2008 – 2010	Inhaber und leitender Tierarzt der Tierarztpraxis Wetli in Mettmenstetten (ZH)

27. Oktober 2010, Mettmenstetten